



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali
Corso di laurea in Produzioni Agroalimentari e Gestione degli
Agroecosistemi

**EFFETTO DELL'ECCESSO DI BORO
SULLO STATO AZOTATO DEL BASILICO
IN COLTURA IDROPONICA**

Relatore

Prof. Alberto Pardossi

Candidato:

Martina Puccinelli

Correlatore:

Prof. Fernando Malorgio

Anno accademico 2013-2014

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale scritto da un'altra persona né materiale utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Il presente lavoro rientra nell'ambito del progetto PRIN 2009 “Risposta fisiologica di alcune specie ortive all'eccesso di boro”. Parte dei dati sono stati già resi noti in un convegno svoltosi il 18 ottobre 2013 a Pisa presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali.

Martina Puccinelli

1 luglio 2014

INDICE

| | |
|---|-----------|
| PREMESSA | 5 |
| Cap. 1 - INTRODUZIONE | 6 |
| 1.1 NITRATI E SALUTE UMANA..... | 6 |
| 1.2 NORME SUL CONTENUTO DI NITRATI NEGLI ALIMENTI..... | 8 |
| Cap. 2 - LA NUTRIZIONE AZOTATA DELLE COLTURE | 11 |
| 2.1 L'AZOTO | 11 |
| 2.2 ASSORBIMENTO DELL'AZOTO | 13 |
| 2.3 ASSIMILAZIONE DELL'AZOTO..... | 17 |
| 2.4 FATTORI CHE INFLUENZANO L'ACCUMULO DEI NITRATI | 24 |
| Cap. 3 – PARTE SPERIMENTALE..... | 28 |
| 3.1 INTRODUZIONE..... | 28 |
| 3.2 OBIETTIVI E APPROCCIO SPERIMENTALE | 32 |
| 3.3 MATERIALI E METODI..... | 33 |
| 3.4 RISULTATI..... | 37 |
| 3.5 DISCUSSIONE..... | 49 |
| 3.6 CONCLUSIONI | 54 |
| BIBLIOGRAFIA | 56 |
| RIASSUNTO | 77 |
| SUMMARY | 78 |
| RINGRAZIAMENTI | 79 |

PREMESSA

L'azoto (N) è un elemento essenziale per le piante, che lo assorbono principalmente come NO_3^- . Questo fa sì che la sua somministrazione alle colture con la concimazione sia spesso necessaria per ottenere produzioni di qualità in quantità elevate. Nonostante ciò un'abbondante concimazione azotata e/o determinate condizioni di crescita possono portare ad un eccessivo contenuto di NO_3^- nei vegetali. Un contenuto elevato di NO_3^- negli alimenti in genere, e quindi anche nei vegetali, è un fatto negativo perché un'eccessiva assunzione di questo composto può essere dannosa per la salute umana.

Il boro (B) è un elemento essenziale per la vita delle piante. Nei sistemi di produzione agricola possono insorgere condizioni di carenza o al contrario di tossicità, per un'eccessiva presenza di B nel terreno e/o nelle acque irrigue. La tossicità da B si manifesta con aree clorotiche, che successivamente evolvono in necrosi, localizzate inizialmente in prossimità del margine fogliare e che successivamente si espandono verso l'interno della foglia.

Ziliani (2013) in esperimenti condotti sulle stesse varietà di basilico oggetto di questa tesi ("Red Rubin" e "Tigullio") aveva riscontrato una correlazione positiva fra eccesso di B e concentrazione fogliare di NO_3^- .

Data l'importanza del controllo della concentrazione di NO_3^- negli ortaggi, la frequenza con cui si utilizzano acque irrigue ricche in B e quanto osservato da Ziliani (2013), si è ritenuto necessario indagare la possibile interazione fra il B e il metabolismo azotato.

Cap. 1 - INTRODUZIONE

1.1 NITRATI E SALUTE UMANA

Il nitrato (NO_3^-) è fondamentale per le piante, essendo la principale forma mediante la quale assumono azoto (N) dal substrato di crescita.

Per quanto riguarda l'influenza di NO_3^- sulla salute umana sono disponibili dati contrastanti, essendo stati riscontrati effetti sia negativi sia positivi.

La maggior parte dell' NO_3^- e del nitrito (NO_2^-) assunti giornalmente con la dieta sono forniti dai vegetali: circa il 75% dell' NO_3^- (Gangolli et al., 1994; Santamaria, 1997) e il 16-43% dell' NO_2^- (Walters, 1991; Cassens, 1995; Santamaria, 1997). Altre importanti fonti di NO_3^- e NO_2^- sono l'acqua e le carni conservate (Walker, 1990). Inoltre NO_3^- e NO_2^- sono presenti in altri tipi di alimenti, oltre ad essere usati come additivi ad azione antimicrobica e conservante, e sono naturalmente prodotti all'interno del corpo umano (Walker, 1990; Gangolli et al., 1994; Speijers, 1996a; Speijers e van den Brandt, 2003a,b).

L' NO_3^- ingerito è facilmente assorbito nella parte superiore dell'intestino tenue (Ellen et al., 1982; Bartholomew e Hill, 1984); successivamente passa nel plasma e nel sangue (Cortas e Wakid, 1991). L' NO_3^- presente nel plasma è selettivamente assorbito dalle ghiandole salivari che ne aumentano la concentrazione di dieci volte e lo secernono nella saliva; l' NO_3^- contenuto nelle ghiandole salivari rappresenta circa il 25% del totale ingerito (Witter e Balish, 1979; Fritsch et al., 1985). I batteri presenti sulla superficie della lingua riducono a NO_2^- circa il 20% dell' NO_3^- secreto nella saliva (Lundberg et al., 2004 e 2008). La conversione di NO_3^- è maggiore nei lattanti e nei soggetti affetti da gastroenteriti, a causa del loro più alto pH gastrico (EFSA, 2008).

Circa il 90% dell' NO_2^- ingerito viene assorbito nel tratto gastro-intestinale (Kortboyer et al., 1997), come tale o convertito nei suoi metaboliti (Speijers et al., 1987).

Nello stomaco, in presenza di condizioni acide, NO_2^- è convertito in acido nitrico e altri metaboliti (McKnight et al., 1997).

La maggior parte dell' NO_3^- assunto è escreto con le urine; una quota importante è però riciclata dai reni attraverso la ricircolazione salivare e biliare (Xia et al., 2003).

NO_3^- di per sé è relativamente poco tossico ma lo diventa una volta convertito in NO_2^- nella saliva (Spiegelhalder et al., 1976; Pannala et al., 2003).

Oltre all' NO_2^- anche i composti dell'N nitroso, le nitrosammine, che si formano dal legame dei nitriti con ad esempio le ammine derivanti dalle proteine, sono tossici e possono causare gravi malattie (Speijers, 1996b; Speijers e van den Brandt, 2003b). Le nitrosammine sono composti cancerogeni (Lijinsky e Epstein, 1970; Mensinga et al., 2003). La formazione di nitrosammine può avvenire durante la conservazione degli alimenti oppure nello stomaco; qui l' NO_2^- che reagisce è sia quello ingerito direttamente sia quello ottenuto dall' NO_3^- , endogeno e esogeno, per riduzione enzimatica nella saliva (Vittozzi, 1992). Abbinare al consumo di prodotti contenenti NO_3^- quello di prodotti contenenti composti antiossidanti, come la vitamina C, può ridurre fino alla metà la quantità di nitrosammine formate (Brambilla e Martelli, 2007). Non è comunque sicura la correlazione tra l'assunzione di nitrati e il rischio tumorale (EFSA, 2008).

NO_2^- svolge la sua azione tossica reagendo con l'emoglobina, con formazione di meta-emoglobina e NO_3^- (Mensinga et al., 2003). Normalmente l'1-3% della emoglobina viene trasformata in meta-emoglobina; quando il livello supera il 10% il trasporto di ossigeno è fortemente limitato; livelli del 20% possono portare a cianosi e intorno al 50% , possono risultare fatali (Mensinga et al., 2003). I lattanti sono i più sensibili alla meta-emoglobinemia, perché sono meno in grado di detossificare la meta-emoglobina rispetto ad individui adulti o anche semplicemente a soggetti che hanno superato lo svezzamento (McKnight et al., 1999; Mensinga et al., 2003).

L' NO_3^- può portare anche all'ipertiroidismo (Van Maanen et al., 1994) ed è stata ipotizzata una correlazione positiva fra l'assunzione di NO_3^- e l'insorgere del diabete mellito in età infantile (Parslow et al., 1997).

Dell' NO_3^- sono stati d'altra parte evidenziati anche alcuni aspetti positivi per la nostra salute. Ad esempio, il monossido di N (NO), che si forma nello stomaco dall' NO_3^- , svolge un'azione antimicrobica (Duncan et al., 1995; McKnight et al., 1999). Inoltre i composti dell'NO sembrano agire come vaso-protettori, andando a ridurre la pressione sanguigna e a inibire l'aggregazione delle piastrine (Webb et al., 2008). Una dieta che comporti una certa assunzione giornaliera di NO_3^- , comunque inferiore alla dose massima tollerabile (ADI, *Acceptable Daily Intake*), può contribuire a mantenere un livello di NO_3^- e NO_2^- tale da determinare effetti positivi sulla salute umana (Lundberg, et al., 2008).



Figura 1. Copertina della rivista "*Cell Metabolism*" nella quale ai possibili effetti benefici dei nitrati è associata la figura di "Braccio di ferro".

Alcuni studi hanno dimostrato che l'assunzione di succo di bietola da orto o il consumo di cibi arricchiti con bietola rossa possono ridurre la pressione vascolare diminuendo così il rischio di contrarre malattie cardio-vascolari (Hobbs et al., 2012). L'azione benefica della bietola rossa è stata attribuita all'alto contenuto di NO_3^- (Larsen et al., 2011; Hobbs et al., 2012). Inoltre, l' NO aumenta l'efficienza respiratoria mitocondriale nei muscoli scheletrici umani riducendo il costo metabolico durante l'esercizio fisico (Larsen et al., 2011; Hobbs et al., 2012). Si può comprendere così il lancio di bevande a base di NO_3^- in occasione delle ultime Olimpiadi di Londra.

1.2 NORME SUL CONTENUTO DI NITRATI NEGLI ALIMENTI

La JECFA (Joint Expert Committee of the Food and Agriculture) e la SCF (European Commission's Scientific Committee on Food) hanno stabilito una ADI di 3,7 mg/kg di peso corporeo (circa 222 mg per un adulto che pesa 60 kg) per NO_3^- , e di 0,07 – 0,06 mg/kg di peso corporeo per NO_2^- (SCF 1992, 1995, 1997; Speijers, 1996a; Speijers e van den Brandt, 2003a,b).

Considerando un valore realistico (in inverno) di NO_3^- nella lattuga di 2220 mg/kg di peso fresco, per un adulto sarebbero sufficienti 100 grammi di consumo per raggiungere la ADI.

A partire dal 1997, la Commissione Europa ha stabilito in diversi Regolamenti il contenuto massimo di NO_3^- in alcune specie di ortaggi e, più tardi, anche negli alimenti per bambini (EC 1999, 2001, 2002, 2004, 2006, 2011).

Il Regolamento CE attualmente in vigore è il n. 1258 del 2011 (**Tab. 1**), che stabilisce i limiti massimi di NO_3^- per spinacio, lattuga e rucola, oltre agli alimenti per bambini.

Questi limiti sono diversi non solo in funzione della specie vegetale ma anche della stagione e del tipo di coltivazione (in serra o in pieno campo). Sono stabiliti limiti maggiori per le condizioni di crescita che renderebbero molto difficile la raccolta di piante con contenuti più bassi di NO_3^- , cioè in autunno-inverno e in serra.

Il Regolamento CE n. 1258/2011 ha alzato i limiti previsti dai Regolamenti precedenti affinché fosse più facile per i produttori rispettarli. Inoltre è stata introdotta fra le colture normate la rucola a causa della sua spiccata tendenza all'accumulo di nitrati e al consumo crescente (fino a qualche anno, la rucola era un ortaggio quasi sconosciuto).

Tabella 1. Massimi livelli di nitrato stabiliti dal Regolamento CE n.1258/2011.

| Prodotto | Periodo di raccolta | NO_3^- (mg/kg p.f.) |
|--|--|---------------------------------|
| Spinaci freschi (<i>Spinacia oleracea</i> L.) | Raccolta dal 1 Novembre al 31 Marzo | 3500 |
| Spinaci conservati, surgelati o congelati | | 2000 |
| Lattuga fresca (<i>Lactuca sativa</i> L.) | Raccolta fra il 1° Ottobre e il 31 Marzo: | |
| (coltivazione in ambiente protetto o in | coltura protetta | 5000 |
| pieno campo), escluso il tipo “iceberg” | pieno campo | 4000 |
| | Raccolta fra il 1° Aprile e il 30 Settembre: | |
| | coltura protetta | 4000 |
| | pieno campo | 3000 |
| Lattuga tipo “iceberg” | Coltura protetto | 2500 |
| | Pieno campo | 2000 |
| Rucola (<i>Eruca sativa</i> , <i>Diplotaxis</i> sp, | Raccolta fra il 1° Ottobre e il 31 Marzo | 7000 |
| <i>Brassica tenuifolia</i> , <i>Sisymbrium</i> | Raccolta fra il 1° Aprile e il 30 Settembre | 6000 |
| <i>tenuifolium</i>) | | |
| Alimenti a base di cereali e alimenti | | 200 |
| destinati a lattanti e ai bambini | | |

Alcuni paesi europei, già prima del Regolamento CE n.1258/2011, avevano introdotto dei limiti alla concentrazione di NO_3^- per il commercio di alcuni ortaggi nel proprio territorio, andando a normare un numero maggiore di specie rispetto a quanto fatto a livello comunitario (**Tab. 2**) (Santamaria, 2006).

Tabella 2. Livelli massimi di nitrato (mg/kg p.f.) per il commercio di alcune specie di ortaggi in alcuni Paesi Europei (Santamaria, 2006).

| Ortaggi | Austria | Belgio | Germania | Olanda | Svizzera |
|--------------------|---------|--------|----------|--------|----------|
| Carota | 1500 | | | | |
| Barbabietola rossa | 4500 | | 3000 | 3500 | 3500 |
| Indivia (estate) | 2500 | 2000 | | 2500 | 2500 |
| Indivia (inverno) | 3500 | 2000 | | 3500 | 3500 |
| Cavolo | 1500 | | | | |
| Ravanello | | | | | 3500 |
| Sedano (verde) | | 5000 | | | |
| Sedano (bianco) | | 4000 | | | |
| Valerianella | | 3500 | 2500 | | |

Cap. 2 - LA NUTRIZIONE AZOTATA DELLE COLTURE

2.1 L'AZOTO

L'azoto (N) è un elemento essenziale per la vita e l'accrescimento delle piante entrando a far parte della struttura di aminoacidi e proteine, nucleotidi e acidi nucleici, vitamine, ecc. Nonostante sia uno degli elementi maggiormente diffusi in natura, costituisce un fattore limitante per lo sviluppo degli organismi viventi, piante incluse, perché spesso non risulta disponibile ai fini della nutrizione (Nannipieri e Perucci, 2003).

Nei terreni agrari, nonostante la concimazione, il bilancio dell'N è sempre negativo, ciò è dovuto al fatto che quest'elemento si accumula in quantità rilevanti nei tessuti vegetali che sono asportati con la raccolta (Nannipieri e Perucci, 2003).

L'N nel terreno subisce numerose trasformazioni, essendo coinvolto in una serie di processi che hanno come obiettivo quello di ripristinarne le scorte nel suolo; convenzionalmente tale ciclo si sviluppa secondo le seguenti fasi (Nannipieri e Perucci, 2003) (**Fig. 2**):

1. fissazione biologica (conversione dell'N atmosferico in N ammoniacale ad opera di microrganismi azotofissatori);
2. mineralizzazione (conversione dell'N organico in N minerale, in tal modo risulta disponibile per la nutrizione vegetale);
3. nitrificazione eterotrofa ed autotrofa (ossidazione di NH_4^+);
4. denitrificazione e riduzione dissimilatoria dell' NO_3^- (in seguito all'azione di batteri denitrificanti si formano composti gassosi dell'N che si disperdono nell'atmosfera);
5. riduzione dell' NO_3^- (avviene all'interno delle piante ad opera di enzimi, porta all'ottenimento di NH_4^+ partendo da NO_3^-);
6. organicazione (l'N ammoniacale è trasformato in N organico);
7. lisciviazione di NO_3^- ;
8. adsorbimento di NH_4^+ ;
9. volatilizzazione di $\text{NH}_3(\text{g})$.

La presenza nei suoli coltivati di adeguate concentrazioni delle forme di N utilizzabili dalle piante è essenziale per le colture vegetali; per questo si ricorre all'impiego di fertilizzanti

azotati, che sono prodotti industrialmente dall' N gassoso presente nell'atmosfera (Bacon, 1995).

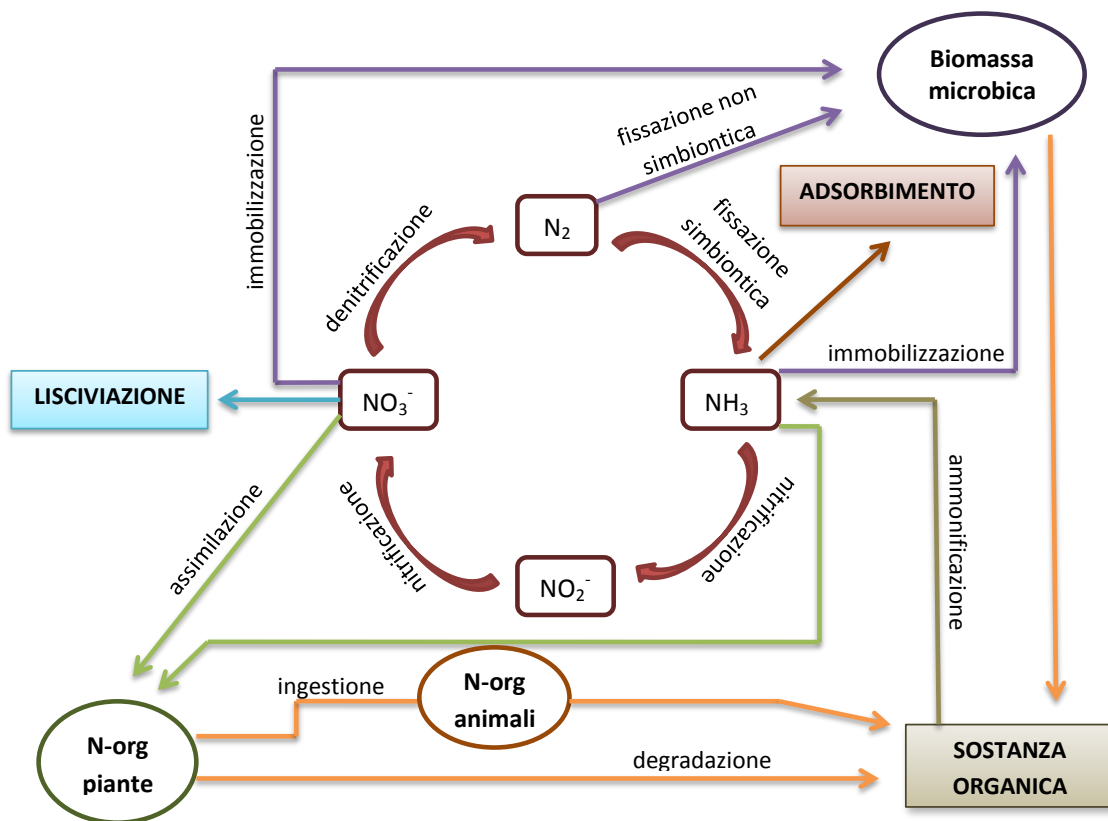


Figura 2. Rappresentazione schematica del ciclo dell'azoto (Nannipieri e Perucci, 2003).

Nella biosfera l' N disponibile per le piante si trova in tre forme diverse: molecolare (N_2), minerale (NO_3^- , NH_4^+ , NO_x , NH_3) e organica (aminoacidi, peptidi, ecc.) (von Wirén et al., 1997). Dal momento che le piante hanno un'elevata necessità di N , sono in grado di utilizzare tutte le forme sopra elencate, anche se per l'utilizzo di N_2 è necessaria la simbiosi con batteri azoto fissatori (von Wirén et al., 1997). L'uso prevalente di una determinata forma rispetto alle altre dipende dalle condizioni ambientali e dalle caratteristiche del terreno, fattori che influenzano la messa a disposizione delle piante delle diverse forme di N (von Wirén et al., 1997). Nei suoli ben areati l' N disponibile si trova principalmente in forma minerale e in particolare come NO_3^- (Strahm e Harrison, 2006), mentre nei suoli che presentano una bassa attività di nitrificazione, ad esempio a causa della bassa temperatura e/o del ristagno idrico, la forma dominante può essere l' NH_4^+ (Sasakawa e Yamamoto, 1978). La concentrazione di NO_3^- nel suolo è molto variabile sia nel tempo che nello spazio, in funzione della natura del terreno, dell'attività dei microrganismi, della

somministrazione o meno di fertilizzanti, ecc. (Miller et al., 2007). Nei terreni agricoli si hanno concentrazioni di NO_3^- comprese fra 0,5 e 10 mM, mentre le concentrazioni di NH_4^+ disponibile sono da 10 a 1000 volte inferiori rispetto a NO_3^- (Marschner, 1995). I bassi livelli di NH_4^+ disponibile nel suolo sono considerati il risultato di una rapida nitrificazione e di una lenta mineralizzazione della sostanza organica presente nel terreno (Chapin et al., 1993). A parità di dotazione del terreno, la forma di N utilizzata dipende dalla singola specie coltivata; però, nella maggioranza dei casi e in presenza di adeguati livelli di N, questa scelta non è obbligata e l'assorbimento di una determinata forma rispetto all'altra è legato al mantenimento dell'equilibrio elettro-chimico a livello cellulare, determinato dal rapporto fra cationi e anioni (Van Beusichem et al., 1988; Kronzucker et al., 1997).

Un eccessivo contenuto di NO_3^- nel terreno, provocato da una rapida mineralizzazione della sostanza organica o da un'eccessiva concimazione azotata, può essere causa, per lisciviazione, di problemi d'inquinamento delle acque superficiali nelle quali, insieme al fosforo, può determinare il fenomeno dell'eutrofizzazione (Masoni, 2010). L'inquinamento da NO_3^- può interessare anche le acque di falda, rendendone difficile ad esempio la potabilizzazione (Masoni, 2010). Per evitare i danni alla salute conseguenti l'assunzione di NO_3^- , a livello comunitario è stato stabilito per le acque potabili il limite massimo di 50 mg/L di nitrati (Masoni, 2010).

2.2 ASSORBIMENTO DELL'AZOTO

Per quanto riguarda l'assorbimento di NO_3^- è stata osservata la presenza di un sistema multifasico costituito almeno da due componenti cinematicamente distinte: un sistema di trasporto ad alta affinità (HATS, High Affinity Transport System) e uno a bassa affinità (LATS, Low Affinity Transport System) (Doddema e Telkamp, 1979; Hole et al., 1990; Siddiqi et al., 1990; Aslam et al., 1992). Studi condotti su *Arabidopsis thaliana* hanno mostrato che a concentrazioni di 100-200 μM l'assorbimento di NO_3^- avviene tramite l'HATS; oltre 200 μM , l'assorbimento avviene tramite il LATS (Doddema e Telkamp, 1979). Il trasporto di NO_3^- tramite HATS e LATS avviene col simporto $2\text{H}^+ : 1\text{NO}_3^-$ (McClure et al., 1990; Glass et al., 1992) (**Fig. 3**); questo spiega la notevole influenza che il pH della rizosfera ha sull'assorbimento di NO_3^- , che è favorito dal pH sub-acido (Haynes, 1986; Tsay et al., 1993).

L'assorbimento di NO_3^- è strettamente controllato dallo stato nutrizionale della pianta relativo alla necessità di N (Doddema e Otten, 1979). Un aumento del tasso di

assorbimento di NO_3^- è stato constatato in alcune specie di piante mantenute precedentemente in un mezzo di crescita senza N (Doddema e Otten, 1979).

Esistono due tipi di HATS, uno inducibile e uno costituzionale (Jackson et al., 1973; MacKown e McClure, 1988; Hole et al., 1990). Secondo Lainé et al., (1995) l'assorbimento costitutivo e quello inducibile sono mediati da due tipi distinti di *carrier*. L'assorbimento di NO_3^- è controllato negativamente tramite un meccanismo a feedback, determinato dalla presenza di NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ e/o di aminoacidi all'interno dei tessuti vegetali, in particolare nelle foglie (Doddema e Otten, 1979; Lee et al., 1992; Muller e Tourraine, 1992; King et al., 1993; Lainé et al., 1995; Aslam et al., 1996a). L'assorbimento netto di NO_3^- è dato dalla combinazione dei flussi in entrata ed in uscita di questo composto; l'efflusso risulta incrementato in presenza di stress biotici (Garcia-Brugger et al., 2006) e abiotici (Macduff e Jackson, 1992; Aslam et al., 1995). Secondo Aslam et al., (1996b) la riduzione dell'assorbimento netto di NO_3^- può essere dovuta anche all'aumento dell'efflusso, ma altri autori (ad es. Lainé et al., 1995) ritengono l'efflusso di NO_3^- poco importante.

Anche l'assorbimento di NH_4^+ avviene tramite un sistema a due fasi (Wang et al., 1993). Nel riso, ad esempio, fino a concentrazioni esterne di 1 mM, l'assorbimento di NH_4^+ è mediato dal sistema HATS; a concentrazioni più alte entra in gioco il LATS (Wang et al., 1993). Anche nell'assorbimento di NH_4^+ interviene un meccanismo di feedback negativo, che agisce sul sistema HATS, mentre non interessa LATS (Wang et al., 1993). Il segnale che attiva il meccanismo di feedback è la concentrazione nelle cellule radicali delle forme dell'N ridotto, quindi non esclusivamente NH_4^+ (Causin e Barneix, 1993). HATS e LATS hanno diversi valori ottimali di pH, ai quali mostrano la maggiore attività di trasporto di NH_4^+ : sono vicini alla neutralità per HATS e compresi fra 4,5 e 6 per LATS (Wang et al., 1993).

In presenza di alti valori di pH e di alte concentrazioni di NH_4^+ , si ha un aumento della concentrazione di NH_3 e della permeabilità della membrana cellulare nei confronti di questo composto rispetto a NH_4^+ ; questi due eventi fanno sì che l'N ammoniacale in queste condizioni sia assorbito principalmente come NH_3 ; questo però non è stato osservato in alcuni studi, nei quali ad alti valori di pH non c'è stato un aumento dell'assorbimento di NH_3 (MacFarlane e Smith, 1982; Schlee e Komor, 1986; Dhyr-Jensen e Brix, 1996). Il significato di NH_3 nell'assorbimento è messo in dubbio, in favore del trasporto di specie cariche, dal fatto che ad alte concentrazioni di NH_4^+ il potenziale di membrana risulta

depolarizzato (Wang et al., 1994) e il sistema HATS è insensibile al pH per valori compresi fra 4,5 e 9 (Wang et al., 1993). Secondo von Wirén et al. (1997), il rapporto di entrata fra NH_3 e NH_4^+ è regolato sia dalle proteine di trasporto che dal pH. È stata dimostrata la dipendenza del trasporto di NH_4^+ dal gradiente di H^+ , esistente fra le cellule dei tessuti radicali e la rizosfera (Wang et al., 1994) (**Fig. 3**).

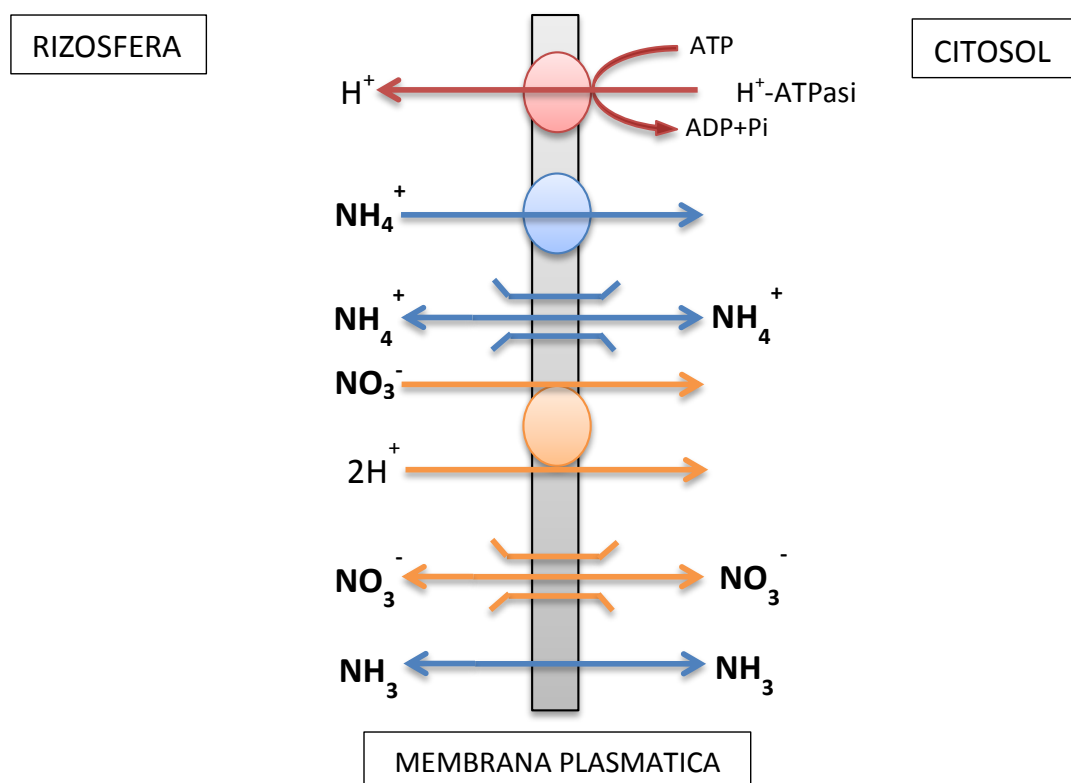


Figura 3. Meccanismi di trasporto, fra rizosfera e cellule radicali, di NO_3^- , NH_4^+ e NH_3 (Nannipieri e Perucci, 2003).

L'assimilazione di NH_4^+ a livello radicale è rapida, mentre il trasporto degli aminoacidi sintetizzati verso le strutture della parte aerea risulta piuttosto lento; pertanto, si può verificare un accumulo di aminoacidi nelle radici che inibisce l'assorbimento di NH_4^+ e ne aumenta l'efflusso, causando una riduzione complessiva dell'assorbimento netto (Rideout et al., 1994; Rawa et al., 1999).

L' NO_3^- , una volta assorbito, è accumulato nell'apparato radicale oppure trasportato, attraverso lo xilema, nella parte aerea della pianta (Meyer e Stitt, 2001). L' NO_3^- nelle cellule vegetali è suddiviso in due frazioni, quella presente nel citosol, che costituisce il pool metabolico, e quella presente nel vacuolo, che costituisce il pool di stoccaggio

(Ferrari et al., 1973; Miller e Smith, 1996) (**Fig. 4**). L' NO_3^- che si accumula nel vacuolo costituisce circa il 90% dell' NO_3^- presente nella cellula (Chen et al., 2004). L' NO_3^- contenuto nel vacuolo può svolgere una funzione di osmoregolazione, soprattutto quando c'è una scarsa disponibilità di soluti organici, es. zuccheri (Blom-Zandstra e Lampe, 1985), e/o di riserva, da utilizzare quando aumenta la crescita della pianta e quindi la domanda di N (Ferrari et al., 1973; Miller e Smith, 1996; Miller e Smith, 2008) (**Fig. 4**).

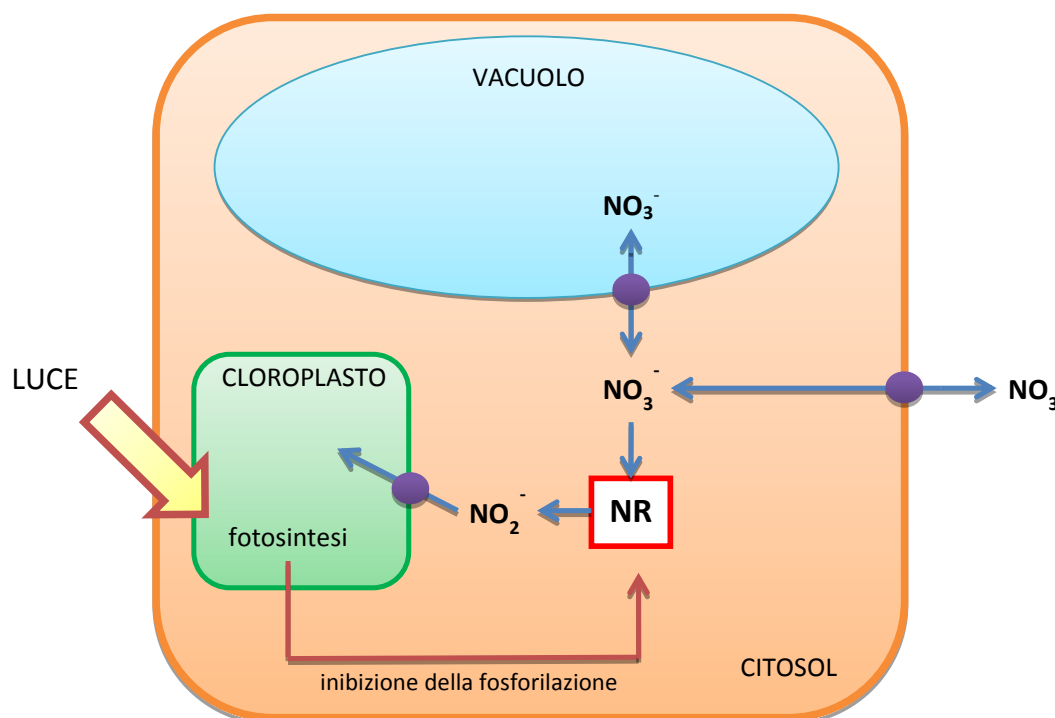


Figura 4. Ruolo della nitrato riduttasi (NR) nella regolazione del contenuto del nitrato (NO_3^-) nel citosol. Alla luce, la fotosintesi attiva la NR inibendo la sua fosforilazione, che ne determinerebbe la perdita di attività. L'attività della NR diminuisce la quantità di NO_3^- accumulato nel vacuolo e aumenta il livello di nitrito (NO_2^-) che passa nel cloroplasto per la sua riduzione ad ammonio.

La concentrazione di NO_3^- aumenta in entrambe le frazioni all'aumentare dell'assorbimento di NO_3^- ; anche se la concentrazione citosolica raggiunge più rapidamente il livello massimo (Aslam e Oaks, 1975; Aslam et al., 1976; Zhen et al., 1991; Devienne et al., 1994; Aslam et al. 2001; Chen et al., 2004).

La concentrazione di NO_3^- del pool metabolico è soggetta a piccole variazioni determinate dalla sua riduzione ad opera della nitrato riduttasi (NR) e influenza il trasporto del NO_3^- da e verso il vacuolo (Cookson et al., 2005). In altre parole, all'aumentare dell'ingresso dell' NO_3^- nella cellula aumenta la concentrazione del pool di riserva nel vacuolo mentre il

pool metabolico rimane relativamente costante (Cookson et al., 2005). Il flusso di NO_3^- attraverso la membrana plasmatica e/o il tonoplasto verso il citosol è maggiore alla luce che al buio (Cookson et al., 2005) (**Fig. 4**).

Ci sono tre famiglie di trasportatori dell' NO_3^- nelle cellule vegetali, tutte e tre agiscono accoppiando il trasporto del NO_3^- a quello dei protoni. Due di queste famiglie, NRT1 e NRT2, determinano un simporto (Tsay, 2007), mentre i CLC funzionano come antiporto (De Angeli et al., 2006).

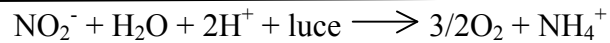
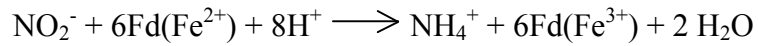
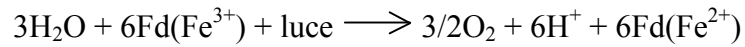
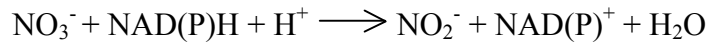
Sulla membrana del tonoplasto è presente un trasportatore di tipo antiporto (Miller e Smith, 1992) che sembra funzionare in abbinamento all'ATPasi vacuolare (Krebs et al., 2010). Il primo trasportatore è stato identificato in *Arabidopsis thaliana*, e si tratta della proteina AtCLCa (De Angeli et al., 2006). Questo trasportatore sarebbe responsabile dell'accumulo di NO_3^- all'interno del vacuolo, attraverso un sistema di antiporto $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ (De Angeli et al., 2006). La proteina che costituisce questo trasportatore fa parte della famiglia di proteine dei canali di trasporto del cloruro (AtCLCs); la differenza di selettività che presenta il trasportatore dell' NO_3^- rispetto agli altri componenti della famiglia è dovuta alla presenza della prolina all'interno della sequenza amminoacidica (Bergsdorf et al., 2009; Wege et al., 2010; Zifarelli e Pusch, 2010). AtCLCa non è l'unico trasportatore per il NO_3^- presente sulla membrana del vacuolo; infatti, è stato visto che anche un'altra proteina, AtCLCb, interviene nel trasporto di questo composto attraverso il tonoplasto (von der Fecht-Bartenbach et al., 2010). Non è ancora chiaro, però, se ne determina l'entrata oppure l'uscita dal vacuolo (von der Fecht-Bartenbach et al., 2010).

Sul tonoplasto è anche presente la proteina codificata dal gene AtNRT2.7, che però è espresso solo nella fase finale della maturazione dei semi (Chopin et al., 2007). Questa proteina agisce incrementando l'influsso di NO_3^- nelle cellule, andando a controllare quindi il contenuto finale di NO_3^- nei semi (Chopin et al., 2007).

2.3 ASSIMILAZIONE DELL'AZOTO

L' NO_3^- utilizzato per l'assimilazione in composti organici è quello presente nel citosol (Ferrari et al., 1973; Miller e Smith, 1996).

La prima fase dell'assimilazione dell' NO_3^- è determinata dall'intervento della NR con formazione di NO_2^- , che successivamente è ridotto a NH_4^+ dalla nitrito riduttasi (NiR) (Wray, 1989; Kleinhofs e Warner, 1990).



Lo ione NH_4^+ è quindi incorporato in un pool di aminoacidi per azione della glutammina sintetasi (GS) e della glutammato sintetasi (GOGAT) (Lea et al., 1990). La GS catalizza la reazione di assimilazione dello ione NH_4^+ , come gruppo ammidico, nella glutammina, avendo come substrato di partenza il glutammato (Lea et al., 1990). Il glutammato usato come substrato in questa reazione è fornito dalla reazione catalizzata dalla GOGAT (Temple et al., 1998) (**Fig. 5**). Durante questa reazione si ha il trasferimento del gruppo ammidico dalla glutammina all' α -chetoglutarato con formazione di due molecole di glutammato; una di queste è utilizzata nella reazione catalizzata dalla GS per formare una nuova molecola di glutammina, mentre l'altra è utilizzata per la biosintesi di altri aminoacidi (Temple et al., 1998) (**Fig. 5**).

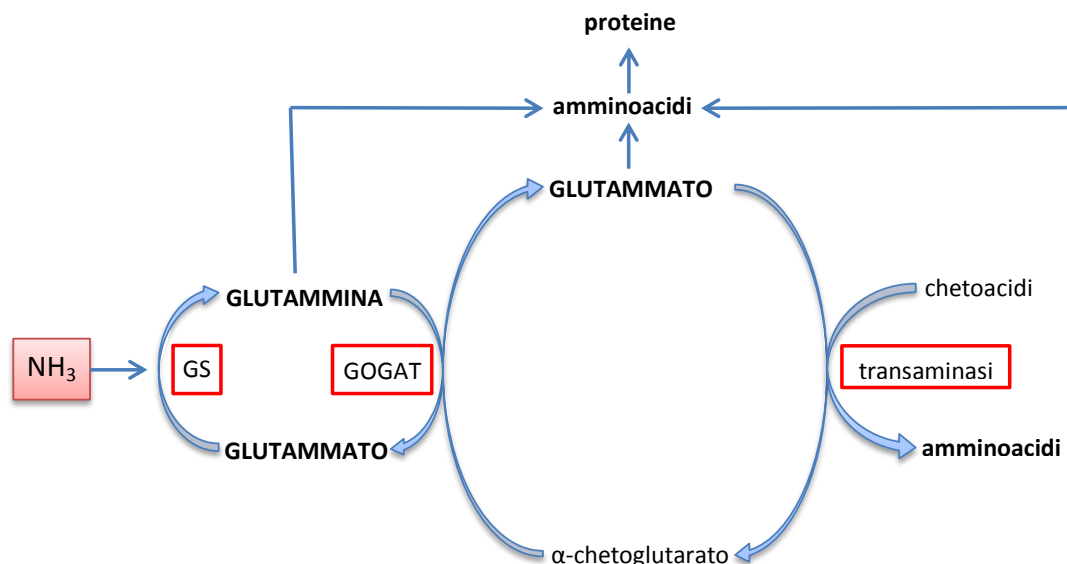


Figura 5. Assimilazione in composti organici dell'azoto ammoniacale (Hirel e Lea, 2001).

La riduzione di NO_3^- a NO_2^- avviene nel citosol (Solomonson e Barber, 1990) mentre quella dell' NO_2^- nei cloroplasti, a livello fogliare, o nei plastidi, a livello radicale (Wray, 1989; Kleinhofs e Warner, 1990). L'incorporazione dell' NH_4^+ nei composti organici può avvenire nel plastidio oppure nel citosol (Lea e Mifflin, 1974; Mifflin e Lea 1976).

Nei cloroplasti è la ferredossina ridotta che dona gli elettroni all' NO_2^- ossidandosi, mentre a livello radicale sembra che questa funzione sia svolta da una proteina simile alla ferredossina, che acquista il suo potere riducente dal NADPH prodotto attraverso la via dei pentosi fosfato (Suzuki et al., 1985).

Nonostante che il processo di riduzione di NO_3^- e quello di NO_2^- avvengano in due compartimenti cellulari distinti (**Fig. 6**), nelle cellule non si ha accumulo di NO_2^- , che è tossico; questo grazie al fatto che l'attività della NiR è sempre maggiore rispetto all'attività della NR (NRA, Nannipieri e Perucci, 2003).

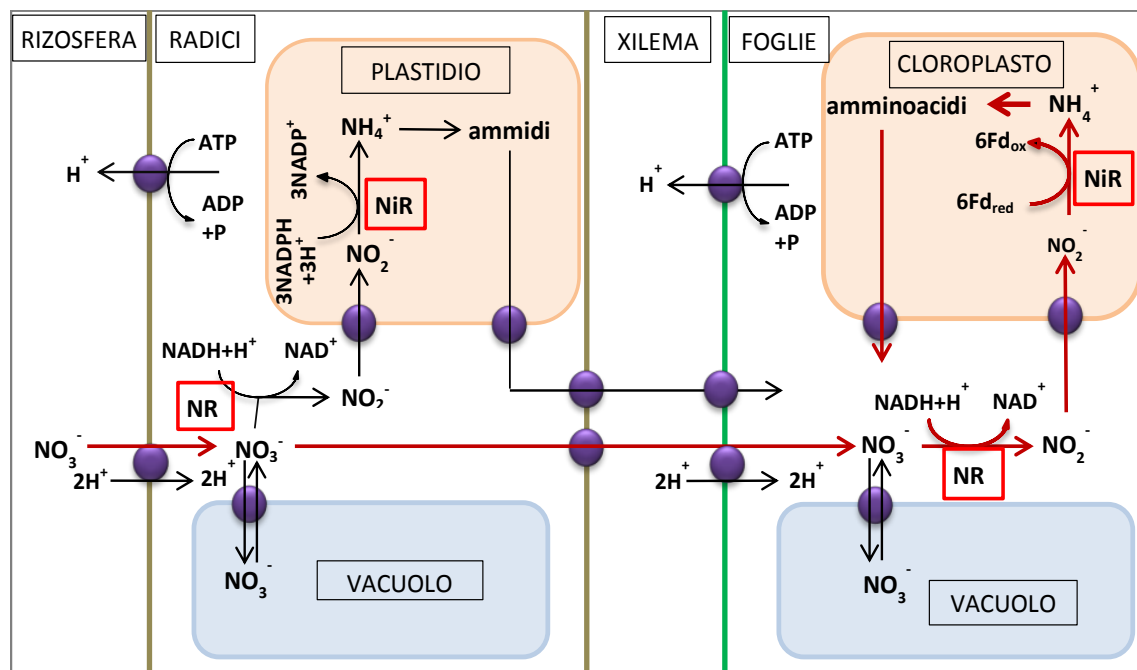


Figura 6. Schema dei processi di riduzione dell'azoto all'interno delle piante (Heldt, 2005).

La NR è localizzata nel citosol (Solomonson e Barber, 1990; **Fig. 6**). Nelle piante sono state trovate due forme di NR, una NADH-specifica, che è la più comune, ed una NAD(P)H-bi-specifica, che può essere presente insieme alla precedente oppure da sola all'interno delle piante, in base alla specie di appartenenza (Streit et al., 1987; Kleinhofs e Warner, 1990).

La struttura della NR è organizzata in tre domini, ognuno dei quali alloggia un diverso gruppo prostetico: FAD, un gruppo eme, di tipo citocromo-b (cyt-b₅₅₇), e un cofattore Molibdeno (MoCo) (Redingbaugh e Campbell, 1985). Questi gruppi hanno il compito di trasferire gli elettroni dal NAD(P)H allo ione NO₃⁻ (Redingbaugh e Campbell, 1985). Nelle piante superiori la NR è un dimero di due subunità identiche, ognuna delle quali ha massa di 100-120 kDa (Solomonson e Barber, 1990). Il dominio N-terminale di questo enzima lega il MoCo, la parte centrale il gruppo eme e quella C-terminale il FAD (Fido, 1991).

Oltre a quella citosolica, è stata rilevata la presenza anche di una NR legata alla membrana plasmatica (Hoarau et al., 1991; Kunze et al., 1997). Questa NR ha delle caratteristiche diverse rispetto all'altra ed è stato ipotizzato che la sua attività sia indotta da elevate concentrazioni di NO₃⁻ (Hoarau et al., 1991; Kunze et al., 1997).

Nei tessuti verdi la NiR è localizzata nei cloroplasti, sulla superficie esterna della membrana tilacoidale, mentre nelle radici si trova nei plastidi (Miflin, 1974) (**Fig. 6**). La NiR è un monomero avente, ad esempio in spinacio, massa molecolare di circa 63 kDa (Siegel e Wilkerson, 1989). È costituita da una metallo-proteina con due gruppi prostetici: un centro di reazione 4Fe/4S e un sireme (Siegel e Wilkerson, 1989).

La GS è rappresentata da due gruppi di proteine che si trovano, rispettivamente, nel plastidio (GS2) o nel citosol (GS1); la GS1 è presente soprattutto nelle cellule dei fasci vascolari, mentre GS2 è localizzata principalmente nelle cellule del mesofillo (McNally e Hirel, 1983). La GS1 è costituita da un sola unità proteica avente massa di circa 34-40 kDa; in alcune specie, però, è costituita da due subunità con massa leggermente diversa fra loro (Woodal et al., 1996). La GS2 è una proteina ottamerica le cui subunità hanno una massa di circa 44-45 kDa, anche se in alcune specie di piante, come ad esempio in pomodoro, è costituita da due tipi di subunità polipeptidiche di massa leggermente diversa (Forde e Cullimore, 1989; Migge et al., 1996).

GS1 è la forma predominante nelle radici, ciò fa ipotizzare che il suo ruolo principale sia quello di catalizzare la reazione di assimilazione dell'N ammoniacale proveniente dalla riduzione di NO₃⁻ (Oaks e Hirel, 1985). In alcune specie, in condizioni di senescenza (Pérez-Rodriguez e Valpuesta, 1996), stress idrico (Bauer et al., 1997) o attacchi di patogeni (Pérez-Garcia et al., 1998), la GS1 è indotta anche nelle foglie; in questi casi, quindi, è stato ipotizzato che possa avere un ruolo anche nel riciclo dell'ammoniaca proveniente dal metabolismo catabolico degli aminoacidi.

Per quanto riguarda la GOGAT, se ne conoscono due forme distinte: una ferredossina-dipendente e una piridin nucleotide-dipendente (Temple et al., 1998). Queste due forme differiscono per la massa molecolare, la composizione aminoacidica, la specificità per l'agente riducente e la funzione metabolica (Temple et al., 1998). La fd-GOGAT è una ferro-zolfo-proteina costituita da una sola unità proteica, avente massa di 130-180 kDa, e si trova nei cloroplasti (Sechley et al., 1992). Anche la NADH-GOGAT è una ferro-zolfo-proteina, è costituita da una sola unità proteica di 220-230 kDa e diversamente dall'altra forma è localizzata principalmente in tessuti non fotosintetizzanti (Temple et al., 1998).

Un altro enzima che interviene nel processo di organicazione dell'N è la glutammato deidrogenasi (GDH), catalizzando la seguente reazione:



La GDH è un esamero le cui subunità proteiche hanno massa di 441-445 kDa ciascuna (Loulakakis e Roubelakis-Angelakis, 1996) ed è ampiamente distribuito nella pianta. A causa della sua scarsa affinità nei confronti di NH_4^+ , la GDH generalmente non è responsabile dell'organicazione dell'N, fatta eccezione per la formazione della riserva azotata, di frutti e semi (Lea e Ireland, 1999).

La regolazione del processo di assimilazione di NO_3^- è di tipo enzimatico. Fra gli enzimi coinvolti quello che ha la maggiore influenza sulla regolazione del processo è la NR. La regolazione della NR, come degli altri enzimi coinvolti nel processo di assimilazione dell'N, può avvenire sia a livello trascrizionale sia post-trascrizionale. A livello trascrizionale i fattori di regolazione agiscono sulla trascrizione del gene codificante la proteina della NR. Il controllo a livello post-trascrizionale è più rapido (Kaiser e Brendle-Behnisch, 1991; MacKintosh, 1992; Lillo et al., 2004) e serve per evitare l'accumulo di NO_3^- durante le ore di buio o in caso di un improvviso ombreggiamento. In questo caso, la regolazione è legata alla fosforilazione della NR e al suo legame con proteine inibitrici (Kaiser e Brendle-Behnisch, 1991; MacKintosh, 1992; Lillo et al., 2004) (**Fig. 7**).

Le proteine coinvolte nel meccanismo di regolazione post-trascrizionale appartengono a due gruppi diversi e il modello di regolazione che è stato proposto si sviluppa in due stadi: dapprima si ha la fosforilazione, reversibile e ad opera di una chinasi, della NR almeno su un residuo di serina (Glaab e Kaiser, 1995; Campbell, 1999), successivamente, quindi, la NR fosforilata si lega ad un fattore chiamato NIP (Nitrate reductase Inactivator Protein)

che agisce interrompendo il trasporto di elettroni fra il cyt-b₅₅₇ e il dominio del MoCo (Glaab e Kaiser, 1995; MacKintosh et al., 1995) (**Fig. 7**).

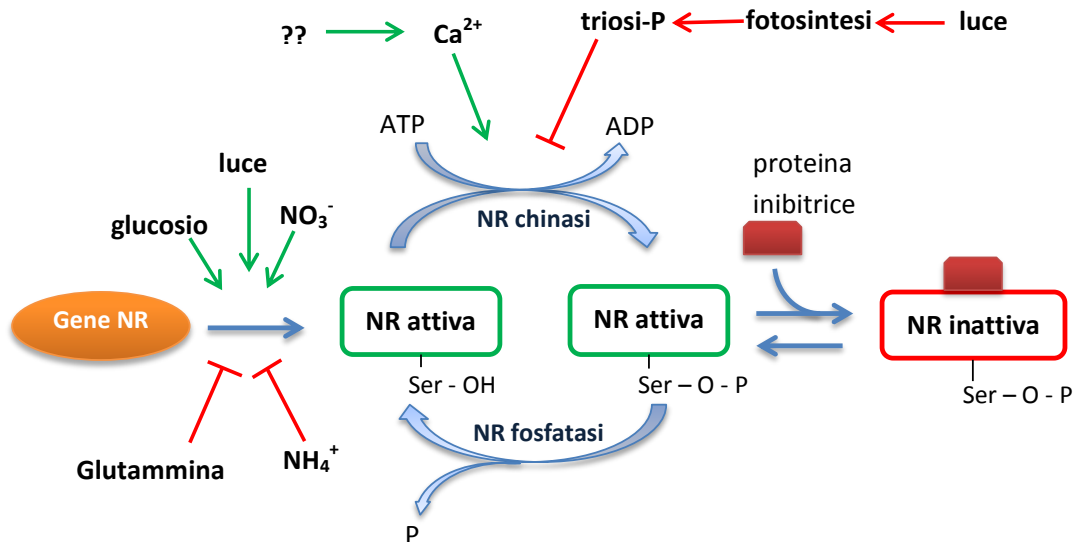


Figura 7. Schema sintetico dei meccanismi di regolazione della nitrato riduttasi (NR) (Heldt, 2005).

Il NIP è stato identificato come un insieme di proteine appartenenti alla famiglia 14-3-3 (Bachmann et al., 1996; Moorhead et al., 1996; Athwal et al., 1998a; Kanamara et al., 1999). I cationi bivalenti, come ad esempio Mg^{2+} , possono legarsi alla proteine 14-3-3 determinandone un cambiamento nella conformazione che risulta necessario per la formazione del complesso NR/14-3-3 (Athwal et al., 1998b). È stato ipotizzato che la fosforilazione del residuo di serina serva a provocare il distacco dalla NR di un fattore di attivazione (NAF) che altrimenti impedirebbe l'attacco delle proteine 14-3-3 (Lillo et al., 1997). La riattivazione della NR avviene ad opera della NRfosfatasi che idrolizza il legame fra serina e gruppo fosfato causando il rilascio della proteina inibitrice (NIP) dall'enzima (Glaab e Kaiser, 1995; McKintosh et al., 1995; Campbell, 1999).

A causa del suo alto tasso di degradazione, la NR ha una vita media di un paio d'ore; quindi questa proteina è continuamente sintetizzata (Campbell, 1999). Agendo sulla sua sintesi è quindi possibile modificare la NRA durante la giornata o quando variano le condizioni di crescita della pianta (Campbell, 1999).

A livello trascrizionale la NR è stimolata principalmente da NO_3^- (Wang et al., 2000; Wang et al., 2004) e dalla luce (Lillo, 2008), oltre che, in misura minore, dal glucosio e dagli altri carboidrati (Lejay et al., 2003). Risulta invece inibita da NH_4^+ , glutammina e altri aminoacidi (Forde, 2002). Questo tipo di regolazione avviene in maniera piuttosto lenta (Campbell, 1999). L'effetto del NO_3^- e della luce sulla regolazione a livello trascrizionale della NR varia in base alla specie vegetale considerata, al tipo di tessuto e alle condizioni sperimentali (Ali et al., 2007). Ad esempio in riso è l' NO_3^- ad avere il ruolo principale mentre la luce ha un'importanza minore (Ali et al., 2007). La regolazione operata a livello trascrizionale dalla luce potrebbe avvenire in modo indiretto attraverso l'aumento dell'attività fotosintetica (Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993). A sostegno di questa ipotesi in alcuni studi è stato dimostrato che la somministrazione di carboidrati può, almeno parzialmente, sostituire la luce nell'indurre la trascrizione della NR (Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993). In un certo numero di specie è stato osservato che una regolazione trascrizionale positiva della NR possa essere operata anche dalle citochinine (Lu et al., 1992; Sutty et al., 1993).

A livello post-trascrizionale nella regolazione della NRA interviene la NRchinasi, che catalizza la reazione di fosforilazione dell'enzima (Glaab e Kaiser, 1995; McKintosh et al., 1995; Campbell, 1999). Dal momento che la NRchinasi è inibita dai triosi-fosfato prodotti dalla fotosintesi, e da altri esteri fosfati, mentre risulta stimolata da ioni Ca^{2+} (Glaab e Kaiser, 1995; Campbell, 1999); questo tipo di regolazione fa sì che la NR sia attiva solo quando è attivo il processo di organizzazione della CO_2 con la formazione degli scheletri carboniosi necessari alla sintesi degli aminoacidi (Glaab e Kaiser, 1995; McKintosh et al., 1995; Campbell, 1999).

Inoltre, la fosforilazione e il legame con le proteine 14-3-3 innescano il processo di degradazione della NR (Huber e Kaiser, 1997). La permanenza al buio delle piante determina un incremento dei legami fra NR e proteine 14-3-3, con conseguente aumento del tasso di degradazione della NR (Weiner e Kaiser, 1999).

In molti casi un aumento della concentrazione di NO_3^- nel substrato di crescita determina un forte aumento della NRA (Chen et al., 2004). È l' NO_3^- appartenente al pool metabolico a regolare la NRA (Ferrari et al., 1973; Aslam et al., 1976; Galangau et al., 1988; Aslam et al., 2001; Cookson et al., 2005). La NRA è positivamente e fortemente influenzata dal livello di NO_3^- citosolico (Ferrari et al., 1973; Aslam et al., 1976; Aslam et al., 2001; Cookson et al., 2005), soprattutto a basse concentrazioni e fino ad una soglia che dipende

dalla specie vegetale, dalla disponibilità di N nel terreno, dall'intensità luminosa, dalla disponibilità idrica, ecc. (Chen et al., 2004).

L' NO_2^- regola in maniera negativa la NRA, soprattutto in condizioni di buio; hanno un effetto simile anche l'N ammoniacale e la glutammina (Shankar e Srivastava, 1998; Ali et al., 2007). Invece hanno un effetto positivo sulla NRA il glutammato e l' α -chetoglutarato (Ali et al., 2007).

Anche se in misura minore, anche gli altri enzimi coinvolti nel processo possono contribuire alla sua regolazione. Almeno a livello trascrizionale è stato osservato che l'espressione della NiR segue quella della NR e avviene in risposta a stimoli sia interni che esterni, come concentrazione di NO_3^- e luce (Sivasankar e Oaks, 1996).

L' NO_3^- agisce positivamente nella regolazione dell'attività delle NiR mediante l'induzione di un enzima specifico per la sintesi del sime (Sakakibara et al., 1996) che si traduce in un aumento dell'attività dell'enzima (Ali et al., 2007). Lo ione NH_4^+ , invece, in presenza di luce, inibisce l'attività della NiR (Ali et al., 2007). Il glutammato e l' α -chetoglutarato non influenzano l'attività della NiR alla luce ma ne determinano un aumento al buio (Ali et al., 2007).

L'azione della GS e della GOGAT è regolata da fattori legati al tipo di organo e allo stadio di sviluppo, dalla forma di N disponibile nel mezzo di crescita, dalla qualità e dall'intensità della radiazione luminosa (Lea e Ireland, 1999). Generalmente, ad una maggiore irradianza corrisponde una maggiore assimilazione di N e quindi una maggiore attività di questi enzimi (Lea, 1990; Lea e Ireland, 1999). La GS ha una grande affinità per l' NH_4^+ ed è attivata da alti valori di ATP, di magnesio e di pH, tutte condizioni che si verificano nei cloroplasti alla luce (Lea et al., 1990).

2.4 FATTORI CHE INFLUENZANO L'ACCUMULO DEI NITRATI

I fattori che influenzano l'assorbimento e l'accumulo di NO_3^- possono essere di tipo genetico, ambientale o colturale (Maynard et al., 1976; Corré e Breimer, 1979; Santamaria et al., 2001). Inoltre, nella stessa specie la concentrazione di NO_3^- varia con il tipo di organo considerato (Meah et al., 1994; Santamaria et al., 1999).

I fattori di tipo genetico sono relativi alla diversa localizzazione, radicale oppure fogliare, ed attività della NR (Pate, 1973); oppure al rapporto non equilibrato fra assorbimento e NRA, alla diversa capacità di assorbimento, di traslocazione e assimilazione dell' NO_3^- (Maynard et al., 1976).

Ci sono famiglie botaniche che hanno una maggiore tendenza all'accumulo di NO_3^- ; come ad esempio le Brassicaceae le Chenopodiaceae, le Apiaceae e le Asteraceae (Corrè e Breimer, 1979; Santamaria et al., 1999) (**Tab. 3**). Il contenuto di NO_3^- varia anche all'interno della specie, tra le cultivar e tra genotipi con diversa ploidia (Blom-Zandstra e Eenink, 1986). Sono state riscontrate differenze in termini di concentrazione di NO_3^- nei tessuti vegetali di diversi genotipi appartenenti alla stessa specie per quanto riguarda molte specie di carota (Gutezeit e Fink, 1999), di sedano rapa (Deroleze e Vulsteke, 1985), di lattuga (Reinink et al., 1987), di indivia (Renink et al., 1994) e di spinacio (Cantliffe, 1973).

I fattori ambientali che influenzano il contenuto di NO_3^- nelle piante sono: irradianza, fotoperiodo, temperatura, umidità atmosferica e contenuto idrico del mezzo di crescita (terreno o substrato).

Tabella 3. Classificazione degli ortaggi in base al contenuto di nitrati (mg/kg p.f.) (Santamaria, 2006).

| MOLTO BASSO (<200) | BASSO (200-500) | MEDIO (500-1000) | ALTO (1000-2500) | MOLTO ALTO (>2500) |
|------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| Carciofo | Broccoli | Cavolo | Sedano-rapa | Sedano |
| Asparago | Carota | Cime di rapa | Cavolo cinese | Cerfoglio |
| Fave | Cavolfiore | Aneto | Indivia | Crescione |
| Cavoletti di Bruxelles | Cetriolo | Radicchio | Scarola | Valerianella |
| Melanzana | Zucca | Verza | Finocchio | Lattuga |
| Aglio | Puntarelle | Rapa | Cavolo-rapa | Ravanello |
| Cipolla | | | Cicoria da foglie | Barbabietola rossa |
| Fagiolini verdi | | | Porro | Rucola |
| Melone | | | Prezzemolo | Spinacio |
| Piselli | | | | Bietola |
| Peperone | | | | |
| Patata | | | | |
| Zucchini | | | | |
| Patata dolce | | | | |
| Pomodoro | | | | |
| Anguria | | | | |

Le piante tendono ad accumulare NO_3^- soprattutto nella stagione autunno-invernale quando la minore intensità luminosa e il fotoperiodo più breve riducono la disponibilità di radiazione per la fotosintesi (Corré e Breimer, 1979; Dennis e Wilson, 2003) e di conseguenza la NRA (Lorenz, 1978). La bassa intensità luminosa determina, in generale, una scarsa efficienza d'uso dell' N , che porta ad un maggior accumulo di NO_3^- (Blom-Zandstra, 1989).

L'accumulo di NO_3^- in presenza di scarsa illuminazione è spiegabile con due meccanismi:

- 1) la regolazione dell'assorbimento di NO_3^- è lenta e quindi non è in grado di adattarlo alla riduzione della richiesta di N organico conseguente al ridotto accrescimento (Cárdenas-Navarro et al., 1998);
- 2) come già anticipato, l' NO_3^- agisce da osmolita al posto dei composti organici, che sono prodotti in quantità insufficienti a causa della scarsa attività fotosintetica (Steingröver et al., 1986a; 1986b; Behr e Wiebe, 1992; McIntyre, 1997).

La lunghezza del fotoperiodo non influenzerebbe la NRA ma piuttosto l'assorbimento di NO_3^- , che risulta minore in condizione di giorni lunghi (Steingröver et al., 1986b). Questo sarebbe dovuto ad una regolazione a feedback effettuata dagli amminoacidi, sintetizzati nelle foglie e traslocati nelle radici, dove inibiscono l'assorbimento di NO_3^- dal terreno (Steingröver et al., 1986b).

La temperatura agisce sul contenuto di NO_3^- nei tessuti vegetali influenzando i processi di assorbimento, traslocazione e assimilazione. In generale, si può dire che un aumento della temperatura determina un incremento dell'accumulo di NO_3^- nei tessuti vegetali (Malorgio et al., 1995), mentre una sua diminuzione comporta una riduzione del contenuto di NO_3^- (Behr e Wiebe, 1992; Lainè et al., 1993).

Sia l'elevata disponibilità idrica sia la siccità possono favorire l'accumulo di NO_3^- ; nel primo caso è favorito l'assorbimento di NO_3^- (Patrino, 1987) mentre nel secondo la NRA è inibita prima rispetto all'assorbimento radicale di NO_3^- (Maynard et al., 1976).

Il contenuto di NO_3^- varia nell'arco della giornata; ad esempio, in rapa (Elia et al., 1997), indivia (Santamaria et al., 1997) e scalogno (Chang et al., 2013), sono stati riscontrati livelli più bassi di NO_3^- nelle foglie durante le ore pomeridiane; al contrario, in basilico nel pomeriggio sono stati osservati contenuti maggiori di NO_3^- (Chang et al., 2013).

Appartengono ai fattori culturali: la quantità di N somministrato alle piante e la forma chimica usata, la disponibilità di altri nutrienti, etc. (Maynard et al., 1976; Corré e Breimer, 1979; Santamaria et al., 2001).

Uno dei fattori maggiormente coinvolti nei processi di assorbimento e accumulo di NO_3^- è la quantità di N disponibile per le piante nel mezzo di crescita (Cantliffe, 1973; Maynard et al., 1976; Santamaria et al., 1997; Santamaria et al., 2001). Generalmente ad una maggiore concentrazione di N nel mezzo di crescita corrisponde un maggiore contenuto di NO_3^- nelle piante (Cantliffe, 1973; Maynard et al., 1976; Santamaria et al., 1997; Santamaria et al., 2001).

Il contenuto di NO_3^- all'interno della pianta varia anche in base al tipo di organo; è maggiore nei piccioli, decresce poi nelle foglie, negli steli, nelle radici, nelle infiorescenze, nei tuberi, nei bulbi e nei frutti, fino ad avere il livello più basso nei semi (Meah et al., 1994; Santamaria et al., 1999). L'elevato contenuto nei piccioli e negli steli è dovuto al fatto che NO_3^- si trova localizzato principalmente nel tessuto xilematico, e questi organi sono particolarmente ricchi di tale tessuto (Pate, 1973). Anche la quantità di nervature presenti in diversi tipi di foglie, esterne ed interne, in radichio, ne può influenzare il contenuto di NO_3^- (Pimpini et al., 2000). Il floema invece trasporta N solamente in forma organica, questo determina il basso contenuto in NO_3^- di semi e frutti, in quanto questi ricevono l'N principalmente attraverso il floema (Quinche e Dvorak, 1980).

La minor efficienza fotosintetica e la maggiore dimensione dei vacuoli delle cellule più vecchie, fa sì che nei tessuti più vecchi siano presenti maggiori concentrazioni di NO_3^- ; differenza che si accentua in condizione di bassa intensità luminosa (Maynard et al., 1976).

Cap. 3 – PARTE SPERIMENTALE

3.1 INTRODUZIONE

La tesi ha come obbiettivo generale quello di studiare l'accumulo di N e di NO_3^- nel basilico coltivato in idroponica, mediante la tecnica del "Floating System", in presenza o meno di un eccesso di B nella soluzione nutritiva. Lo studio rientra in una ricerca più ampia sugli effetti della tossicità da B sugli ortaggi (Progetto PRIN 2009 "Risposta fisiologica di alcune specie ortive all'eccesso di boro"). L'idea progettuale è nata da una serie di considerazioni riguardanti la coltivazione idroponica del basilico, che può determinare un eccessivo accumulo di NO_3^- nei tessuti fogliari, e gli effetti sulle piante di un'eccessiva concentrazione di B nell'acqua irrigua.

La scelta del metodo di coltivazione in idroponica è stata dettata sia dalla maggiore possibilità di controllo delle condizioni sperimentali, sia dal fatto che questa tecnica è largamente utilizzata per la produzione del basilico, per la quale comporta dei vantaggi non trascurabili.

La coltivazione del basilico

Il basilico (*Ocimum basilicum* L., appartenente alla famiglia delle Lamiaceae) è una pianta annuale originaria dell'India e diffusa in tutto il mondo, soprattutto in Asia, Africa, Sud America e nell'Area Mediterranea. Il basilico ha una rilevante importanza come erba medicinale e come spezia per l'uso in cucina, oltre che per l'uso tradizionale nella preparazione del "pesto genovese". In commercio si trova fresco, congelato o essiccato. Fra i principali composti che determinano benefici per la salute ci sono quelli che hanno azione antiossidante, quali vitamina C, vitamina E, carotenoidi e composti fenolici come l'acido rosmarinico (Rice-Evans et al, 1996; Loughrin e Kasperbauer, 2001; Sgherri et al, 2003; Tsai et al, 2007). Il basilico è anche molto ricco in oli essenziali.

Il basilico è largamente coltivato sia in pieno campo sia in coltura protetta. Negli ultimi anni si è diffusa la coltivazione in idroponica di questa pianta aromatica.

La coltivazione in idroponica in serra, in effetti, consente di standardizzare le condizioni di coltivazione, ottimizzando il processo di produzione (Canter et al., 2005). Il prodotto ottenuto con la coltivazione in idroponica risulta pulito e privo di molti agenti contaminanti

che spesso si ritrovano nelle piante coltivate a terra (Pardossi et al., 2006). La tecnica idroponica più utilizzata per il basilico è il “Floating System”; sistema di coltivazione basato sull’impiego di semplici vasche riempite con soluzione nutritiva arieggiata sulla quale galleggiano pannelli di polistirolo perforato che fungono da supporto per le piantine (idroponica galleggiante). Tale tecnica è utilizzata generalmente per la coltivazione di vegetali da foglia (Miceli et al., 2003). Questo tipo di coltivazione richiede minor investimenti e costi di gestione rispetto ad altre tecniche idroponiche (Galloway, 1996) ma la sua applicazione è limitata agli ortaggi coltivati per brevi periodi e ad alta densità come ad esempio rucola, lattuga e spinacio, oltre appunto al basilico (Miceli et al., 2003).

Nutrizione azotata del basilico

In basilico la concimazione azotata risulta essenziale se si vuole ottenere un prodotto di qualità e in quantità elevate (Golcz et al., 2006). La somministrazione di N è ad esempio uno dei fattori che maggiormente influenza la composizione e la quantità degli oli essenziali (Politycka e Golcz, 2004; Daneshian et al., 2009).

Concimazioni azotate eccessive o effettuate in maniera non corretta possono però portare ad un aumento eccessivo del contenuto di NO_3^- nelle foglie (Biesiada e Kuś, 2010). Il basilico è considerato una specie con una moderata tendenza ad accumulare NO_3^- (Biesiada e Kuś, 2010). I valori del contenuto di NO_3^- nel basilico riportati in letteratura sono molto variabili, da 321 a 5250 mg/kg p.f., in dipendenza anche della disponibilità di N nel mezzo di crescita (Majkowska-Gadomska et al., 2009; Seidler-Lożykowska et al., 2009; Biesiada e Kuś, 2010; Chang et al., 2013).

Si conoscono molte varietà di basilico, alcune a foglie viola utilizzate soprattutto per scopi ornamentali. Secondo alcuni autori, le varietà viola contengono più NO_3^- delle varietà a foglia verde (Majkowska-Gadomska et al., 2009; Biesiada e Kuś, 2010).

La concentrazione del NO_2^- nelle foglie ha un andamento piuttosto diverso rispetto a quello di NO_3^- , con un range di concentrazioni molto più stretto, che va da 1,9 a 4,9 mg/kg p.f. (Chang et al., 2013).

Effetto dell’eccesso di B

Il B è un elemento essenziale per la vita delle piante, soprattutto perché interviene a livello della parete cellulare regolandone la dimensione dei pori e stabilizzandone la componente pectinica (Brown et al., 2002), attraverso l’integrazione della sua struttura con il complesso

ramnogalatturonani II-borato, che forma legami covalenti fra ramnogalatturonani II e omogalatturonani (Ishii e Matsunaga, 2001). Il B è anche coinvolto nel metabolismo dei carboidrati, con i quali forma dei complessi favorendone il movimento all'interno dei vasi conduttori (Katyal e Randhawa, 1983). Si pensa inoltre che il B vada a complessare i composti fenolici riducendone la tossicità per i tessuti vegetali; azione che spiegherebbe la formazione di zone necrotiche in condizioni di carenza di B (Lee e Arnoff, 1967). Interviene, infine, nella regolazione dei flussi idrici all'interno delle piante, aiutando a mantenerli ad un livello ottimale (Sharma e Ranchandra, 1990).

Nei sistemi di produzione agricola possono insorgere condizioni di carenza di B, soprattutto in zone umide e piovose, o al contrario di tossicità, per un'eccessiva concentrazione di questo elemento nel terreno e/o nelle acque irrigue (Gupta et al., 1985; Kot, 2008; Tanaka e Fujiwara, 2008).

Le piante a livello radicale assorbono il B come acido borico (Tanaka e Fujiwara, 2008). In condizioni non limitanti per quanto riguarda la disponibilità di B nel terreno, l'assorbimento avviene principalmente in modo passivo mentre in presenza di concentrazioni limitanti l'assorbimento è di tipo attivo, cioè attraverso trasportatori specifici (BOR) o canali regolati dall'attività di particolari proteine (Tanaka e Fujiwara, 2008).

Il B è traslocato all'interno delle piante secondo due meccanismi. Il primo è tipico di molte specie di ortaggi compreso il basilico, e implica un trasporto esclusivamente attraverso lo xilema (Brown e Shelp, 1997; Noguchi et al, 2000). In questo caso, il B tende ad accumularsi nelle foglie (in particolare ai margini), che quindi sono gli organi più colpiti in condizioni di eccesso di B (Brown e Shelp, 1997; Noguchi et al, 2000). Il secondo meccanismo caratterizza alcune specie arboree come melo, pero e pesco, e prevede anche una ritraslocazione del B attraverso il floema, grazie al legame di questo elemento con dei polialcoli come mannitolo e sorbitolo (Brown e Shelp, 1997; Noguchi et al, 2000).

La tossicità da B si manifesta con aree clorotiche, che successivamente evolvono in necrosi, localizzate inizialmente in prossimità del margine fogliare per poi espandersi verso l'interno della foglia (Nable et al., 1997). La concentrazione di B in queste aree risulta superiore rispetto a quella presente nelle zone di tessuto apparentemente sano (Nable et al., 1997). Le foglie che presentano tali sintomi sono soggette ad uno sviluppo ridotto e hanno una ridotta attività fotosintetica e traspiratoria (Nable et al., 1997). I danni alla produzione

dovuti alla tossicità del B possono essere più o meno rilevanti in base alla durata del ciclo produttivo della coltura d'interesse e alla precocità con cui si manifestano i sintomi; si ha un limitato effetto della tossicità sulla produzione, in caso di colture a ciclo breve, se i sintomi si manifestano tardi e se sono colpite principalmente le foglie più vecchie (Nable et al., 1997).

La tolleranza delle piante alla tossicità da B varia da specie a specie e può essere limitata a singoli organi o riguardare l'intera pianta (Nable et al., 1997). Secondo Nable et al. (1997), in frumento, pomodoro, girasole, limone, carciofo e in alcune leguminose, le varietà più tolleranti presentano anche una concentrazione di B nei tessuti significativamente inferiore rispetto a quelle meno tolleranti. In questo caso, la tolleranza sarebbe legata ad un meccanismo di esclusione del B (Nable et al., 1997). Altri studi hanno mostrato che piante di *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh che sovraesprimono il gene atBOR4, e che quindi possiedono un numero maggiore di trasportatori BOR, hanno una maggiore tolleranza al B, dovuta ad una superiore capacità di allontanare il B dal citoplasma (Miwa et al., 2007; Sutton et al., 2007).

Interazione fra B e metabolismo azotato

Soltanto pochi studi hanno esaminato la relazione esistente fra eccesso di B e metabolismo azotato.

In pomodoro e peperone, Eraslan et al. (2007a) hanno registrato un aumento della NRA, della concentrazione di prolina e della permeabilità cellulare in condizioni di eccesso di B. Al contrario, Mahboobi et al. (2002), in grano e orzo, e Cervilla et al. (2008), in pomodoro, hanno riscontrato una riduzione della NRA nelle piante sottoposte ad un eccesso di B. Secondo Mahboobi et al. (2002), questa riduzione non è dovuta unicamente all'effetto diretto del B ma anche una riduzione della richiesta di N organico in conseguenza della minore crescita.

Mahboobi et al. (2002) e Cervilla et al. (2008) hanno osservato anche un aumento dell'attività della GDH in presenza di concentrazioni tossiche di B. Cervilla et al. (2008), inoltre, hanno registrato anche un aumento dell'attività di GS e GOGAT, suggerendo che questi enzimi potrebbero svolgere un ruolo protettivo nei confronti del B. Cervilla et al. (2008), inoltre, hanno osservato, sempre in pomodoro, che l'eccesso di B riduceva il contenuto dell'N ridotto, del NO_3^- e delle proteine solubili, ma aumentava il contenuto di aminoacidi. La minor concentrazione di NO_3^- potrebbe essere dovuta a cambiamenti di

natura elettrochimica della membrana plasmatica, che porterebbero ad una riduzione dell'assorbimento o del trasporto del NO_3^- (Cervilla et al., 2008).

3.2 OBIETTIVI E APPROCCIO SPERIMENTALE

Sono stati condotti tre esperimenti per studiare gli effetti di una diversa concentrazioni di NO_3^- e di B nella soluzione nutritiva sulla crescita e il contenuto minerale di piante di basilico coltivato in idroponica in serra durante l'autunno del 2013. In due esperimenti è stato determinata anche la NRA (*in vivo*) nei tessuti delle foglie mediane.

Tutti e tre gli esperimenti sono stati condotti usando due varietà di basilico che, in precedenti studi (Landi et al., 2013a, 2013b; Ziliani, 2013), avevano mostrato una diversa tolleranza all'eccesso di B: "Tigullio", sensibile; "Red Rubin", più resistente (**Fig. 8**). La prima varietà presenta foglie verdi e un accrescimento più veloce rispetto alla seconda, che ha le foglie di colore viola (più o meno intenso) grazie alla presenza di un'elevata concentrazione di antociani nelle cellule epidermiche.



Figura 8. Piante delle due varietà di basilico allevate in idroponica con 20 mg/L di B nella soluzione nutritiva. La varietà viola ("Red Rubin") è più tollerante all'eccesso di B della varietà verde ("Tigullio"), come indicato dalla minore incidenza dei tipici sintomi della tossicità da B (clorosi e necrosi fogliari).

In esperimenti condotti da Ziliani (2013) le piante, di entrambe le varietà, trattate con l'eccesso di B (20 mg/L di B), mostravano una concentrazione di NO_3^- significativamente maggiore rispetto ai controlli. La maggiore concentrazione di NO_3^- nelle piante allevate in presenza di alte concentrazioni di B potrebbe essere la conseguenza della minore attività fotosintetica (Landi et al., 2013a) e quindi della minore disponibilità di potere riducente necessario ai processi di riduzione dell' NO_3^- . Il diverso comportamento in termini di suscettibilità all'eccesso di B e capacità di accumulare NO_3^- rende le varietà di basilico "Tigullio" e "Red Rubin" un interessante modello per lo studio dell'influenza di concentrazioni tossiche di B sul metabolismo dell'N e l'accumulo fogliare di NO_3^- .

3.3 MATERIALI E METODI

I tre esperimenti sono stati condotti all'interno di una serra in ferro e vetro nel periodo autunnale del 2013. Nella **Tabella 4** sono riportati i dati cronologici e colturali (data di semina, trapianto, inizio e termine degli esperimenti; densità colturale; volume unitario di soluzione nutritiva e i dati relativi al clima) delle diverse prove.

Tabella 4. Sintetica descrizione degli esperimenti 1, 2 e 3.

| | Esp. 1 | Esp. 2 | Esp. 3 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| Semina | 26 Agosto | 2 Settembre | 16 Settembre |
| Trapianto | 16 Settembre | 9 Ottobre | 28 Ottobre |
| Inizio esperimento | 23 Settembre | 16 Ottobre | 4 Novembre |
| Fine esperimento | 23 Ottobre | 22 Novembre | 12 Dicembre |
| Età delle piante a fine esperimento (giorni dalla semina) | 59 | 81 | 88 |
| Durata del trattamento (giorni) | 30 | 36 | 39 |
| Densità (n. di piante per vasca) | 16 | 16 | 16 |
| Densità (n. di piante per m ²) | 26 | 26 | 26 |
| Volume sol. nutritiva (L/pianta) | 3,12 | 3,12 | 3,12 |
| Temperatura media giornaliera (°C) | 25,8 | 22,8 | 16,3 |
| Umidità relativa (%) | 88,7 | 89,2 | 95,8 |
| Radiazione solare (MJ/m ² ·giorno) | 5,6 | 3,8 | 3,4 |

*Valori medi durante l'esperimento

I semi sono stati seminati all'interno di vassoi alveolati contenenti cubetti (*plug*) di lana di roccia, e messi a germinare in una camera di crescita. Le piantine sono state poi trasferite in serra subito dopo l'emergenza e, dopo circa una settimana sono state trapiantate nei vassoi utilizzati per il "Floating System". Il trattamento con le diverse concentrazioni di B e N è iniziato una settimana dopo il trapianto ed è durato da 30 a 39 giorni.

Le condizioni climatiche all'interno della serra, nel periodo durante il quale sono stati condotti gli esperimenti, sono state in linea con quelle che normalmente caratterizzano le zone Mediterranee nel periodo autunnale (**Fig. 9**). La temperatura dell'aria è diminuita nel corso della stagione, con valori massimi superiori a 30°C e minimi inferiori a 5°C. Anche la radiazione luminosa è diminuita nel corso della stagione, sia in termini di intensità che ovviamente di fotoperiodo (**Fig. 9**).

Sono state preparate quattro soluzioni nutritive derivanti dalla combinazione di due concentrazioni di N (10 e 20 mM) e due concentrazioni di B (0,25 e 20 mg/L.). Per ogni combinazione di concentrazione di B e N in soluzione nutritiva sono state effettuate tre repliche. In tutti i casi è stata usata acqua piovana (EC = 0,26 dS/m). Il B era aggiunto come acido borico.

La composizione della soluzione con 10 mM di N era la seguente: N-NO₃ 9,50 mM, N-NH₄ 0,86 mM, P-PO₄ 1 mM, K 10 mM, Ca 5,02 mM, Mg 1,50 mM, per quanto riguarda i macroelementi e Na 0,48 mM, S-SO₄ 5,95 mM, Cl 1,23 mM, Fe 40 µM, Cu 3,6 µM, Zn 9,2 µM, Mn 10,9 µM, Mo 1 µM, relativamente ai microelementi. La composizione della soluzione con 20 mM di N era invece la seguente: N-NO₃ 19 mM, N-NH₄ 1,30 mM, P-PO₄ 1 mM, K 10 mM, Ca 7,32 mM, Mg 3,84 mM, per i macroelementi e Na 0,48 mM, S-SO₄ 5,95 mM, Cl 1,48 mM, Fe 40 µM, Cu 3,6 µM, Zn 9,2 µM, Mn 10,9 µM, Mo 1µM per i microelementi.

I sali utilizzati per la preparazione della soluzione con 10 mM di N sono stati: nitrato di calcio agricolo, cloruro di calcio diidrato, solfato di magnesio tecnico, fosfato monopotassico e solfato di potassio. Per l'altra soluzione (20 mM di N) i sali utilizzati sono stati: nitrato di calcio agricolo, cloruro di calcio diidrato, solfato di magnesio tecnico, nitrato di magnesio, fosfato monopotassico e solfato di potassio. Per entrambe le soluzioni nutritive sono stati utilizzati anche dei chelati (EDDHA o EDTA) di Fe, Cu e Mn, e del molibdato di sodio. Non è stato aggiunto Zn in quanto la concentrazione di questo elemento nell'acqua piovana era sufficiente, a causa probabilmente della contaminazione

da parte della struttura zincata della serra. L'acqua piovana, infatti, era quella raccolta dalle gronde della serra e conteneva anche piccole quantità di Ca, Mg, Na e SO_4^{--} .

I valori della EC delle soluzioni erano di 2,51 dS/m per quella con 10 mM di N e 3,43 dS/m per quella con 20 mM di N.

Quasi tutti i giorni veniva effettuato il controllo di EC e pH della soluzione e se necessario si interveniva per riportare il pH a valori prossimi a 5,7, tale correzione era effettuata con acido solforico al 20%. In tutti e tre gli esperimenti la soluzione nutritiva era arieggiata mediante un compressore e rinnovata con cadenza settimanale.

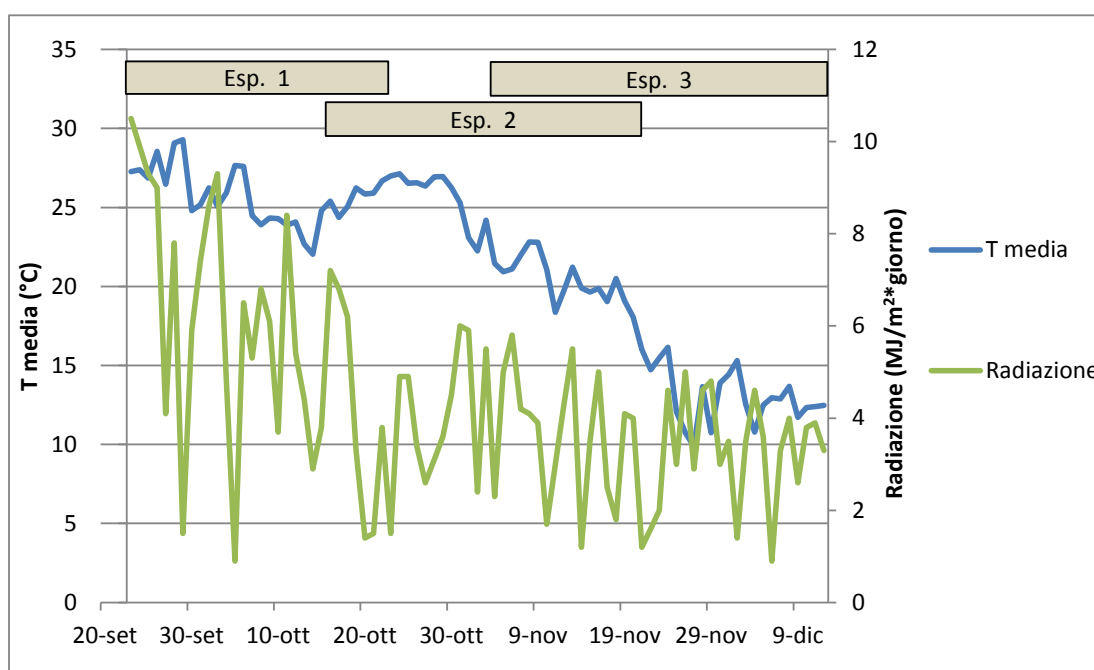


Figura 9. Valori medi della temperatura dell'aria e della radiazione solare all'interno della serra utilizzata per gli esperimenti sul basilico. Le barre orizzontali indicano il periodo del trattamento sperimentale nelle prove.

Determinazioni analitiche

Al termine di ogni esperimento le piante sono state campionate per effettuare le analisi in laboratorio; sono stati raccolti tre campioni per ogni trattamento.

I campioni sono stati lavati, prima con acqua potabile e poi deionizzata, pesati e fatti asciugare in stufa ventilata a 80°C fino a peso costante. I campioni asciutti sono stati nuovamente pesati; successivamente sono stati tritati e digeriti a caldo in ambiente acido (240 °C, 2 ore; miscela 5:2 v/v di acido nitrico 65% e perclorico 65%) all'interno di tubi di

teflon (B-free). Sul prodotto digerito si è stato determinato il contenuto dei seguenti elementi:

- 1) B con il metodo dell'Azometina-H (Page et al., 1982);
- 2) P con il metodo del molibdato (Olsen et al., 1982);
- 3) K, Ca, Mg e altri microelementi (Fe, Mn, Zn e Cu) con uno spettrofotometro ad assorbimento atomico (Varian Model Spectra-AA240 FS, Australia).

Sui campioni disidratati è stato determinato il contenuto di N-NO_3^- e N ridotto. Per la determinazione del contenuto di N-NO_3^- l'estrazione dei campioni è stata effettuata con acqua distillata e il contenuto di N-NO_3^- , nella soluzione ottenuta con l'estrazione, è stato determinato con il metodo colorimetrico dell'acido salicilico (Cataldo et al., 1975). Per la determinazione dell'N ridotto è stato utilizzato il metodo Kjeldahl (Kacar, 1972).

Nell'esperimento 3, i campioni sono stati suddivisi in foglie apicali, foglie mediane, foglie basali, fusti e radici; tutti i campioni così ottenuti sono stati trattati nello stesso modo e sottoposti alle medesime analisi effettuate sui campioni degli esperimenti precedenti.

Tutti i dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza a tre vie, impiegando il software "Statgraphics". Il confronto tra le medie è stato effettuato usando il test della minima differenza significativa.

Al termine di tutti e tre gli esperimenti è stata effettuata, sulle foglie mediane, anche l'analisi della NRA. Tale analisi è stata eseguita *in vivo* misurando per via colorimetrica la quantità di NO_2^- che si forma nei campioni (dischetti fogliari) in presenza di una concentrazione non limitante di NO_3^- .

L'altro metodo di misura della NRA, detto *in vitro*, prevede l'estrazione e la purificazione dell'enzima, di cui poi si misura l'attività sempre misurando la quantità di NO_2^- formato (Brunetti e Hageman, 1976). I valori di attività che si ottengono generalmente sono maggiori con il metodo *in vitro* rispetto a quello *in vivo* ma entrambi i metodi forniscono in genere lo stesso andamento della NRA in piante coltivate nelle stesse condizioni e campionate allo stesso momento (Brunetti e Hageman, 1976).

Il protocollo di analisi è stato predisposto in base a quanto riportato da Chopra (1983), Privalle et al.(1989), e Vogel e Dawson (1991).

Per effettuare l'analisi sono stati pesati 0,3 g di campione ottenuto tagliando una porzione di foglia raccolta; il campione così ottenuto è stato riposto in una provetta da 10 mL immersa nel ghiaccio. Per ogni trattamento sono stati prelevati due campioni, denominati t_0 e t_{30} , e sono state effettuate 4 repliche. Ad ogni campione t_0 sono stati aggiunti 5 mL della

soluzione tampone A, mentre ad ogni campione t_{30} sono stati aggiunti 5mL della soluzione tampone B. La soluzione tampone A conteneva: 100 mM di tampone fosfato a pH 7,5 e 5% (v/v) di isopropanolo. La soluzione tampone B conteneva: 100 mM di tampone fosfato a pH 7,5, 30 mM di KNO_3 e 5% (v/v) di isopropanolo. I campioni t_0 sono stati posti a bagno in acqua bollente per 5-10 minuti e successivamente lasciati raffreddare a temperatura ambiente. I campioni t_{30} sono stati posti in un bagno termostato a 30°C per 30 minuti e mantenuti in agitazione. Al termine dell'incubazione i campioni t_{30} sono stati posti in acqua bollente per 5-10 minuti e successivamente lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Quando le provette contenenti i campioni avevano raggiunto la temperatura ambiente sono stati aggiunti 5 mL di reattivo colorimetrico, preparato nel seguente modo: 1% sulfanilamide in HCl 3,0 N, 0,02% N naftin-etilen-diamina-dicloruro. Dopo aver miscelato accuratamente il loro contenuto, le provette sono state poste al buio a temperatura ambiente per 15 minuti. A questo punto è stata determinata l'assorbanza dei campioni a 540 nm ed è stata calcolata la concentrazione di NO_2^- in base alla curva di calibrazione, determinata usando soluzioni a diversa concentrazione di KNO_2 (0; 2,5; 5; 10; 20 e 25 μM).

Al termine dell'esperimento 1, l'analisi della NRA è stata effettuata, per entrambi i trattamenti alle diverse concentrazioni di B, solo sulle foglie mediane prelevate dalle piante di "Tigullio" trattate con 20 mM di N; la stessa analisi è stata ripetuta alle 8:00, alle 11:00 e alle 14:30 del medesimo giorno. Mentre al termine degli esperimenti 2 e 3 l'analisi è stata eseguita, una sola volta alle 11:00, in tutti i trattamenti per entrambe le varietà.

3.4 RISULTATI

Dal momento che si sono ottenuti risultati simili in tutti e tre gli esperimenti, per chiarezza di esposizione si è scelto di esporre in maniera dettagliata solo i risultati del terzo esperimento, riferendoci ai precedenti solo nei casi particolarmente significativi.

Crescita

Come previsto, la cultivar "Tigullio" si è accresciuta di più dell'altra e alla fine dell'esperimento la biomassa secca delle piante a foglia verde era quasi il doppio di quella delle piante a foglie viola (**Tab. 5**).

In questo esperimento, i tassi di crescita sono stati assai inferiori rispetto quelli osservati nelle due prove precedenti a causa dalle peggiori condizioni ambientali: sono stati infatti

registrati valori sensibilmente più bassi della radiazione solare e soprattutto della temperatura dell'aria (**Tab. 4**). La concentrazione di N in soluzione non ha avuto effetti importanti sulla produzione di biomassa (**Tab. 5**).

Tabella 5. Effetto della concentrazione di nitrato e di boro nella soluzione nutritiva sul peso secco della parte aerea e delle radici di due cultivar di basilico, coltivate in idroponica, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

| Cultivar | N-NO ₃ ⁻ (mM) | B (mg/L) | Peso secco (g/pianta) | |
|--------------|--|-------------|-----------------------|-------------|
| | | | Radici | Parte aerea |
| Tigullio | 10 | 0,25 | 0,14 b | 1,05 a |
| | | 20 | 0,02 d | 0,44 b |
| | 20 | 0,25 | 0,18 a | 1,13 a |
| | | 20 | 0,02 d | 0,43 b |
| Red Rubin | 10 | 0,25 | 0,03 d | 0,58 b |
| | | 20 | 0,02 d | 0,48 b |
| | 20 | 0,25 | 0,05 c | 0,59 b |
| | | 20 | 0,02 d | 0,42 b |
| ANOVA | | | | |
| Cultivar (A) | | | *** | *** |
| Boro (B) | | | *** | *** |
| Nitrato (C) | | | ** | ns |
| A x B | | | *** | *** |
| A x C | | | ns | ns |
| B x C | | | ** | ns |
| A x B x C | | | ns | ns |

^a L'analisi della varianza a tre vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B), del nitrato (C) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; *, significativa al 5%; **, significativa all'1%; ***, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD.

Quando le piante sono state trattate con 20 mg/L di B, la crescita è stata fortemente inibita in “Tigullio”, soprattutto a livello radicale, indipendentemente dalla concentrazione di N della soluzione nutritiva (**Tab. 5**). Invece, non si sono osservate differenze significative nel caso della cultivar “Red Rubin” per quanto riguarda tutti i parametri determinati, ad eccezione di una leggera riduzione del peso secco delle radici nelle piante coltivate con la concentrazione di N più alta (**Tab. 5**). Rispetto all'altra cultivar, le piante di “Red Rubin”

hanno manifestato i tipici sintomi della tossicità da B più tardi e in modo assai meno marcato (**Fig. 10**).



Figura 10. Sintomi di tossicità del boro in due cultivar di basilico coltivate in idroponica, rispettivamente con 10 mM e 20 mM di N nella soluzione nutritiva, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

Contenuto di azoto ridotto e nitrico

Il contenuto di N ridotto delle radici e del fusto non è stato influenzato in modo significativo da nessuno dei fattori considerati né si sono osservate interazioni significative tra di loro (**Tab. 6**). Nelle piante sottoposte all'eccesso di B il contenuto di N nitrico ha subito una riduzione nelle radici e nei fusti di entrambe le varietà; nei fusti tale riduzione si è avuta solo quando le piante erano coltivate con la più alta concentrazione di N nella soluzione nutritiva (**Tab. 6**). Dai dati raccolti non emerge un gradiente del contenuto fogliare di N nitrico passando dalle foglie basali a quelle apicali; mediamente, il contenuto di N nitrico è stato leggermente più alto nelle foglie mediane (**Tab. 6**). Si è invece osservato un gradiente del contenuto di N ridotto, che è aumentato passando dalle foglie basali a quelle apicali (**Tab. 6**).

Rispetto a “Tigullio”, “Red Rubin” aveva un maggior contenuto fogliare di N nitrico in tutti e tre i tipi di foglie considerati (**Tab. 6**), anche se le differenze tra le due varietà sono state più marcate nelle foglie basali. Quando si considera l’N ridotto, le differenze tra le due varietà sono state meno evidenti (**Tab. 6**); in generale, però, i livelli determinati in

“Red Rubin” (36-56 g/kg p.s.) sono stati leggermente inferiori a quelli dell’altra cultivar (39–63 g/kg p.s.). Il rapporto tra N nitrico e N ridotto è stato di 1:5, approssimativamente, più basso rispetto a quello rilevato nei precedenti due esperimenti (dati non riportati).

La concentrazione di B e di NO_3^- nella soluzione nutritiva non ha influenzato il contenuto fogliare di N con tre eccezioni, peraltro poco importanti (**Tab. 6**):

- 1) nelle foglie basali di “Tigullio” il contenuto di N ridotto è stato leggermente superiore alla concentrazione di 20 mM di N nella soluzione nutritiva rispetto a quello misurato nelle piante allevate con 10 mM;
- 2) l’eccesso di B ha determinato una riduzione dell’accumulo di N nitrico nelle foglie mediane delle piante di “Tigullio” coltivate con la concentrazione più alta di N nella soluzione nutritiva. Questo effetto, però, è stato modesto e oltretutto è stato osservato solo in due esperimenti su tre;
- 3) in “Red Rubin” l’eccesso di B ha determinato un aumento del livello di N nitrico nelle foglie apicali delle piante coltivate con la concentrazione più alta di N in soluzione. Questo effetto, però, non è stato osservato negli altri esperimenti.

Concentrazione di B

La concentrazione di N nella soluzione nutritiva non ha avuto effetti degni di nota sulla concentrazione di B nei vari organi considerati (**Tab. 7**).

Tra le due varietà non si sono osservate differenze nel contenuto di B nelle foglie e nei fusti quando le piante erano coltivate con la concentrazione di controllo di questo elemento (0,25 mg/L; **Tab. 7**).

Come previsto, la coltivazione delle piante con 20 mg/L di B ha determinato un notevole aumento del contenuto di questo elemento nelle radici, nei fusti e nelle foglie, però con differenze importanti tra le due varietà (**Tab. 7**):

- 1) l’aumento dei livelli di B nelle radici si è osservato solo in “Red Rubin” (questo fenomeno però non è stato osservato nei primi due esperimenti);
- 2) l’incremento della concentrazione di B nel fusto e nelle foglie è stato più marcato in “Red Rubin”, come anche osservato negli esperimenti 1 e 2.

Tabella 6. Effetto della concentrazione di nitrato e di boro nella soluzione nutritiva sul contenuto di azoto nitrico e ridotto (espresso in g/kg p.s.) in due cultivar di basilico, coltivate in idroponica, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

| Cultivar | N-NO ₃ ⁻ (mM) | B (mg/L) | Concentrazione di N-NO ₃ ⁻ (g/kg p.s.) | | | | | Concentrazione di N ridotto (g/kg p.s.) | | | | |
|--------------|-------------------------------------|----------|--|-----------|----------------|----------------|---------------|---|--------|----------------|----------------|---------------|
| | | | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali |
| Tigullio | 10 | 0.25 | 14,1 ab | 12,9 bcd | 6,5 c | 9,6 c | 6,2 cd | 51,2 a | 43,2 a | 60,3 b | 57,5 ab | 40,2 bcd |
| | | 20 | 7,3 d | 13,1 abcd | 6,6 bc | 7,7 c | 5,5 d | 45,4 a | 40,8 a | 62,8 ab | 53,6 b | 40,9 bc |
| | 20 | 0.25 | 14,0 ab | 16,4 ab | 7,5 ab | 12,2 ab | 7,4 bcd | 54,6 a | 44,7 a | 62,9 ab | 59,1 a | 46,0 a |
| | | 20 | 9,5 cd | 12,7 cd | 6,7 bc | 7,7 c | 4,9 d | 51,9 a | 39,4 a | 65,7 a | 54,1 ab | 43,8 ab |
| Red Rubin | 10 | 0.25 | 12,9 ab | 16,3 abc | 10,1 a | 13,4 a | 8,6 ab | 49,0 a | 39,4 a | 53,9 c | 47,4 c | 36,1 e |
| | | 20 | 11,8 bc | 13,2 abcd | 9,0 abc | 11,9 ab | 11,5 a | 48,2 a | 43,6 a | 54,0 c | 47,8 c | 39,4 cde |
| | 20 | 0.25 | 15,7 a | 16,6 a | 7,1 bc | 10,7 bc | 9,6 ab | 51,2 a | 41,1 a | 55,8 c | 45,9 c | 36,7 de |
| | | 20 | 12,1 bc | 10,4 d | 11,0 a | 12,2 ab | 11,5 a | 51,0 a | 39,0 a | 48,6 d | 46,8 c | 39,8 cd |
| ANOVA | | | | | | | | | | | | |
| Cultivar (A) | | | * | ns | ** | ** | *** | ns | ns | *** | *** | *** |
| Boro (B) | | | *** | ** | ns | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Nitrato (C) | | | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | * |
| A x B | | | * | ns | ns | * | ** | ns | ns | ** | ns | * |
| A x C | | | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | * | ns | * |
| B x C | | | ns | ns | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| A x B x C | | | ns | ns | ** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

^a L'analisi della varianza a tre vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B), del nitrato (C) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; *, significativa al 5%; **, significativa all'1%; ***, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD.

Tabella 7. Effetto della concentrazione di nitrato e di boro nella soluzione nutritiva sul contenuto di boro (espresso in mg/kg p.s.) in due cultivar di basilico, coltivate in idroponica, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

| Cultivar | N-NO ₃ ⁻ (mM) | B (mg/L) | Concentrazione di B (mg/kg p.s.) | | | | |
|--------------|--|-------------|----------------------------------|--------|-------------------|-------------------|------------------|
| | | | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali |
| Tigullio | 10 | 0,25 | 151 c | 105 d | 84 c | 126 c | 114 d |
| | | 20 | 126 cd | 205 cd | 390 b | 525 b | 488 c |
| | 20 | 0,25 | 156 c | 103 d | 93 c | 103 c | 118 d |
| | | 20 | 95 d | 358 b | 381 bc | 488 b | 645 b |
| Red Rubin | 10 | 0,25 | 209 b | 71 d | 90 c | 81 c | 97 d |
| | | 20 | 656 a | 577 a | 638 a | 818 a | 996 a |
| | 20 | 0,25 | 213 b | 86 d | 86 c | 102 c | 121 d |
| | | 20 | 648 a | 556 b | 578 ab | 576 a | 706 b |
| ANOVA | | | | | | | |
| Cultivar (A) | | | *** | ** | *** | * | *** |
| Boro (B) | | | *** | *** | *** | *** | *** |
| Nitrato (C) | | | ns | ns | ns | * | ns |
| A x B | | | *** | ** | *** | ** | *** |
| A x C | | | ns | ns | ns | ns | *** |
| B x C | | | ns | ns | ns | * | * |
| A x B x C | | | ns | ns | ns | * | *** |

^a L'analisi della varianza a tre vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B), del nitrato (C) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; *, significativa al 5%; **, significativa all'1%; ***, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD.

Concentrazione degli altri elementi nutritivi

Il numero di elementi nutritivi considerati, dei trattamenti a confronto e anche delle prove condotte hanno originato un quadro molto complesso da descrivere e da interpretare. Tra l'altro, in molti casi gli effetti di uno o più fattori di variabilità e delle loro interazioni è stato modesto oppure è stato osservato solo in uno o due dei tre esperimenti condotti. Pertanto, ci limitiamo a considerare solo gli effetti della concentrazione di B nella soluzione nutritiva e della varietà (**Tab. 8, 9, 10 e 11**). In sintesi, sono questi i risultati:

Tabella 8. Effetto della concentrazione di nitrato e di boro nella soluzione nutritiva sul contenuto di macronutrienti, P e K (espressi in g/kg p.s.), in due cultivar di basilico coltivate in idroponica, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

| Cultivar | N-NO ₃ ⁻ (mM) | B (mg/L) | P (g/kg p.s.) | | | | | K (g/kg p.s.) | | | | |
|-----------|--|-------------|---------------|-------|-------------------|-------------------|------------------|---------------|----------|-------------------|-------------------|------------------|
| | | | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali |
| Tigullio | 10 | 0,25 | 7,0 b | 4,2 a | 3,5 b | 3,7 ab | 4,6 a | 30,5 d | 51,4 abc | 49,0 b | 49,4 cd | 46,7 b |
| | | 20 | 7,3 b | 3,9 a | 3,1 b | 4,2 ab | 4,4 a | 44,3 bc | 63,6 ab | 60,5 a | 56,8 bc | 49,1 b |
| | 20 | 0,25 | 7,2 b | 4,4 a | 3,9 ab | 4,5 ab | 4,5 a | 27,7 d | 48,1 bc | 32,8 b | 37,3 d | 50,9 b |
| | | 20 | 6,3 b | 4,4 a | 3,4 b | 4,1 ab | 4,5 a | 31,0 cd | 50,3 abc | 64,1 a | 63,1 ab | 52,4 b |
| Red Rubin | 10 | 0,25 | 9,3 b | 3,9 a | 3,7 ab | 4,7 a | 4,6 a | 66,2 a | 69,2 a | 46,3 b | 70,0 a | 87,8 a |
| | | 20 | 16,7 a | 4,3 a | 3,8 ab | 4,6 a | 4,2 a | 52,6 ab | 61,0 ab | 47,9 b | 67,1 ab | 56,5 b |
| | 20 | 0,25 | 9,0 b | 4,0 a | 3,3 b | 4,3 ab | 4,1 a | 62,5 a | 41,5 c | 26,3 c | 41,1 d | 59,0 b |
| | | 20 | 14,5 a | 4,1 a | 4,6 a | 3,3 b | 3,5 a | 28,5 d | 37,4 c | 24,1 c | 40,3 d | 50,6 b |

ANOVA

| | | | | | | | | | | |
|--------------|-----|----|----|----|----|-----|----|-----|-----|-----|
| Cultivar (A) | *** | ns | ns | ns | ns | *** | ns | *** | ns | *** |
| Boro (B) | ** | ns | ns | ns | ns | * | ns | *** | * | ** |
| Nitrato (C) | ns | ns | ns | ns | ns | ** | ** | *** | *** | * |
| A x B | ** | ns | * | ns | ns | *** | ns | *** | ** | ** |
| A x C | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ** | *** | ** |
| B x C | ns | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns | ns | ns |
| A x B x C | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

^a L'analisi della varianza a tre vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B), del nitrato (C) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; *, significativa al 5%; **, significativa all'1%; ***, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD.

Tabella 9. Effetto della concentrazione di nitrato e di boro nella soluzione nutritiva sul contenuto di macronutrienti, Ca e Mg (espressi in g/kg p.s.), in due cultivar di basilico coltivate in idroponica, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

| Cultivar | N-NO ₃ ⁻ (mM) | B (mg/L) | Ca (g/kg p.s.) | | | | | Mg (g/kg p.s.) | | | | |
|-----------|--|-------------|----------------|---------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|---------|-------------------|-------------------|------------------|
| | | | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali |
| Tigullio | 10 | 0,25 | 3,9 cd | 14,4 a | 16,3 a | 21,8 a | 29,5 a | 4,2 bc | 3,4 b | 4,5 b | 4,9 a | 6,3 a |
| | | 20 | 5,9 b | 10,1 bc | 13,6 bc | 16,1 c | 23,5 b | 5,0 ab | 2,4 de | 4,1 bc | 4,0 b | 6,3 a |
| | 20 | 0,25 | 3,6 d | 14,4 a | 12,8 c | 17,6 bc | 29,0 a | 3,0 c | 3,1 bc | 3,4 d | 3,7 bc | 5,3 ab |
| | | 20 | 5,1 bc | 9,5 c | 12,2 c | 16,0 c | 22,5 b | 5,4 ab | 1,9 e | 3,2 d | 3,1 d | 5,3 ab |
| Red Rubin | 10 | 0,25 | 6,0 ab | 13,8 a | 16,0 ab | 19,1 ab | 22,9 b | 5,1 ab | 4,2 a | 5,1 a | 5,2 a | 5,8 ab |
| | | 20 | 7,4 a | 10,1 bc | 11,2 cd | 12,1 d | 12,7 c | 6,6 a | 2,8 bcd | 3,6 cd | 3,3 cd | 3,0 c |
| | 20 | 0,25 | 5,1 bc | 12,4 ab | 12,9 c | 18,6 bc | 23,6 b | 4,1 bc | 3,1 bc | 3,7 cd | 3,8 bc | 4,8 b |
| | | 20 | 5,9 b | 9,4 c | 9,0 d | 9,3 e | 9,9 c | 5,8 ab | 2,5 cd | 2,2 e | 2,4 e | 2,3 c |

ANOVA

| | | | | | | | | | | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| Cultivar (A) | *** | ns | * | *** | *** | * | ** | ns | ns | *** |
| Boro (B) | *** | *** | *** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | *** |
| Nitrato (C) | * | ns | *** | ** | ns | ns | ** | *** | *** | ** |
| A x B | ns | ns | * | ** | * | ns | ns | *** | ** | *** |
| A x C | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| B x C | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| A x B x C | ns | ns | ns | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

^a L'analisi della varianza a tre vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B), del nitrato (C) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; *, significativa al 5%; **, significativa all'1%; ***, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD.

Tabella 10. Effetto della concentrazione di nitrato e di boro nella soluzione nutritiva sul contenuto di micronutrienti, Fe e Zn (espressi in mg/kg p.s.), in due cultivar di basilico coltivate in idroponica, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

| Cultivar | N-NO ₃ ⁻ (mM) | B (mg/L) | Fe (mg/kg p.s.) | | | | | Zn (mg/kg p.s.) | | | | |
|-----------|--|-------------|-----------------|--------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|--------|-------------------|-------------------|------------------|
| | | | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali |
| Tigullio | 10 | 0,25 | 1792 cd | 405 a | 161 cd | 159 b | 193 c | 221 c | 233 c | 171 c | 209 b | 256 bc |
| | | 20 | 4544 abcd | 249 ab | 155 cd | 192 b | 310 bc | 340 bc | 382 a | 229 a | 206 b | 286 ab |
| | 20 | 0,25 | 1632 d | 254 ab | 299 b | 179 b | 241 bc | 224 c | 303 b | 185 bc | 229 ab | 304 ab |
| | | 20 | 6762 a | 219 ab | 191 c | 359 a | 357 ab | 496 a | 381 a | 207 ab | 258 a | 345 a |
| Red Rubin | 10 | 0,25 | 3488 bcd | 411 a | 489 a | 244 ab | 492 a | 362 ab | 245 bc | 163 c | 165 c | 197 c |
| | | 20 | 4116 abcd | 175 b | 215 c | 160 b | 249 bc | 428 ab | 182 c | 89 e | 79 d | 107 d |
| | 20 | 0,25 | 4646 abc | 125 b | 159 cd | 164 b | 317 bc | 394 ab | 244 bc | 133 d | 169 c | 202 c |
| | | 20 | 5112 ab | 107 b | 119 d | 109 b | 225 bc | 480 ab | 211 c | 96 e | 74 d | 111 d |

ANOVA

| | | | | | | | | | | |
|--------------|----|----|-----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| Cultivar (A) | ns | ns | * | ns | ns | * | *** | *** | *** | *** |
| Boro (B) | ** | * | *** | ns | ns | ** | ns | ns | *** | ns |
| Nitrato (C) | ns | * | ** | ns | ns | ns | ns | ns | * | * |
| A x B | * | ns | ** | * | ** | ns | *** | *** | *** | *** |
| A x C | ns | ns | *** | * | ns | ns | ns | ns | * | ns |
| B x C | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| A x B x C | ns | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ** | ns | ns |

^a L'analisi della varianza a tre vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B), del nitrato (C) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; *, significativa al 5%; **, significativa all'1%; ***, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD.

Tabella 11. Effetto della concentrazione di nitrato e di boro nella soluzione nutritiva sul contenuto di micronutrienti, Cu e Mn (espressi in mg/kg p.s.), in due cultivar di basilico coltivate in idroponica, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

| Cultivar | N-NO ₃ ⁻ (mM) | B (mg/L) | Cu (mg/kg p.s.) | | | | | Mn (mg/kg p.s.) | | | | |
|-----------|--|-------------|-----------------|-------|----------------|----------------|---------------|-----------------|-------|----------------|----------------|---------------|
| | | | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali | Radici | Fusti | Foglie apicali | Foglie mediane | Foglie basali |
| Tigullio | 10 | 0,25 | 69 b | 19 bc | 24 ab | 21 b | 19 bc | 84 b | 85 b | 115 b | 156 a | 192 ab |
| | | 20 | 76 ab | 32 a | 28 a | 27 a | 26 a | 96 b | 101 a | 143 a | 150 a | 182 abc |
| | 20 | 0,25 | 68 b | 19 bc | 19 c | 17 c | 17 c | 93 b | 95 ab | 122 ab | 155 a | 199 a |
| | | 20 | 82 ab | 23 b | 24 ab | 24 b | 25 ab | 200 a | 95 ab | 141 a | 170 a | 190 ab |
| Red Rubin | 10 | 0,25 | 78 ab | 17 cd | 21 bc | 16 cd | 18 bc | 66 b | 69 c | 107 b | 123 b | 164 bc |
| | | 20 | 80 ab | 17 cd | 18 cd | 17 c | 16 c | 104 b | 53 d | 75 c | 77 c | 78 d |
| | 20 | 0,25 | 100 a | 15 cd | 14 de | 13 d | 16 c | 100 b | 53 d | 84 c | 125 b | 148 c |
| | | 20 | 84 ab | 12 d | 13 e | 10 e | 13 c | 176 a | 55 cd | 81 c | 78 c | 80 d |

ANOVA

| | | | | | | | | | | |
|--------------|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cultivar (A) | ns | *** | *** | *** | ** | ns | *** | *** | *** | *** |
| Boro (B) | ns | * | ns | ** | ns | *** | ns | ns | ** | *** |
| Nitrato (C) | ns | * | *** | *** | ns | *** | ns | ns | ns | Ns |
| A x B | ns | ** | ** | *** | ** | ns | * | ** | *** | *** |
| A x C | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | Ns |
| B x C | ns | * | ns | ns | ns | ** | ns | ns | ns | Ns |
| A x B x C | ns | ns | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns | Ns |

^a L'analisi della varianza a tre vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B), del nitrato (C) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; *, significativa al 5%; **, significativa all'1%; ***, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD.

E' stato osservato un significativo aumento del contenuto radicale di P nelle piante di "Red Rubin" coltivate alla concentrazione più alta di B nella soluzione nutritiva (**Tab. 8**). Il contenuto di K nelle foglie apicali e mediane nelle piante di "Tigullio" coltivate alla concentrazione più alta di B era significativamente più alto rispetto ai valori delle piante di controllo (**Tab. 8**). L'eccesso di B ha ridotto, anche se non sempre in maniera significativa, il contenuto di Ca e Mg nella parte aerea; mentre ne ha determinato un significativo aumento nelle radici di Tigullio (**Tab. 9**).

L'eccesso di B ha determinato anche un decremento del contenuto di Fe nei fusti di entrambe le varietà e nelle foglie di "Red Rubin" (**Tab. 10**). Al contrario, il contenuto di Fe (**Tab. 10**) e Mn (**Tab. 11**) è aumentato nelle radici delle piante di entrambe le varietà coltivate con 20 mg/L di B nella soluzione nutritiva, anche se questo effetto nel caso del Mn è stato osservato soltanto alla concentrazione più alta di N nella soluzione nutritiva.

Il contenuto fogliare di Cu è aumentato nelle piante di "Tigullio" in presenza di alto B (**Tab. 11**).

Nitrato riduttasi (NR)

Né il genotipo né la concentrazione di N in soluzione ha avuto un effetto significativo sulla NRA determinata in vivo sulle foglie mediane prelevate in tarda mattinata (**Tab. 12**).

In "Tigullio", la NRA è rimasta abbastanza costante, indipendentemente dalla concentrazione di B (**Tab. 12**). I valori determinati nella varietà verde in questo esperimento sono simili anche a quelli riscontrati nella prova precedente in campioni di foglie raccolti alla stessa ora. Nel primo esperimento, invece, erano stati osservati valori assai più bassi (quasi la metà); inoltre, l'elevata concentrazione di B nella soluzione nutritiva aveva aumentato la NRA, ma solo quando i campioni erano stati prelevati intorno alle 11:00. E' stato questo risultato che ci ha portato a ripetere la misura della NRA anche negli esperimenti successivi, raccogliendo i campioni allo stesso orario.

In "Red Rubin" la NRA è stata generalmente superiore rispetto a quella riscontrata nel secondo esperimento (non era stata determinata invece durante il primo). In questa varietà, l'eccesso di B ha determinato un aumento della NRA ad entrambe le concentrazioni di N in soluzione, in accordo con quanto osservato nell'esperimento 2 (**Tab. 12**).

Tabella 12. Effetto della concentrazione di nitrato e di boro nella soluzione nutritiva sull'attività della nitrato riduttasi (NR) (espressa in $\mu\text{mol nitrito}/(\text{g p.f.}\cdot\text{h})$) nelle foglie mediane di due cultivar di basilico coltivate in idroponica, in serra, per 39 giorni nell'autunno del 2013 (Esperimento 3).

| Cultivar | N-NO ₃ ⁻ (mM) | B (mg/L) | Attività NR (μmol nitrito/(g p.f.*h)) |
|--------------|--|-------------|--|
| Tigullio | 10 | 0,25 | 141 b |
| | | 20 | 135 b |
| | 20 | 0,25 | 121 bc |
| | | 20 | 137 b |
| Red Rubin | 10 | 0,25 | 75 c |
| | | 20 | 238 a |
| | 20 | 0,25 | 111 bc |
| | | 20 | 195 a |
| ANOVA | | | |
| Cultivar (A) | | | ns |
| Boro (B) | | | *** |
| Nitrato (C) | | | ns |
| A x B | | | *** |
| A x C | | | ns |
| B x C | | | ns |
| A x B x C | | | * |

^a L'analisi della varianza a tre vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B), del nitrato (C) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; *, significativa al 5%; **, significativa all'1%; ***, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD.

3.5 DISCUSSIONE

Tolleranza al B delle due varietà

Nelle piante di entrambe le varietà, la concentrazione di B nei tessuti fogliari presenta un gradiente decrescente passando dalle foglie basali a quelle apicali (**Tab. 7**). Questo risultato è spiegabile col fatto che l'accumulo di B è progressivo nel tempo essendo funzione della quantità di acqua traspirata (Carmassi et al., 2013); dipende quindi dall'età delle foglie. Al momento del campionamento, le foglie basali, più vecchie, avevano ovviamente traspirato una maggior quantità di acqua rispetto a quelle poste più in alto e più giovani; pertanto, presentavano livelli di B più alti.

In generale, i valori della concentrazione fogliare di B non hanno superato 800-1000 (mg/kg p.s.; **Tab. 7**). Questi valori sono più bassi di quelli riportati da Ziliani (2013), che aveva osservato contenuti fogliari di B intorno a 1600 mg/kg.

I dati ottenuti in questa tesi indicano la maggior tolleranza all'eccesso di B della cultivar "Red Rubin" rispetto a "Tigullio", in accordo con lavori precedenti (Landi et al., 2013a; Ziliani, 2013). La maggiore resistenza al B della varietà "Red Rubin" è indicata dalla minore inibizione della crescita delle piante allevate con una concentrazione di 20 mg/L di B in soluzione (**Tab. 5**) e da una minore gravità delle necrosi fogliari (**Fig. 10**), che costituiscono i tipici sintomi della tossicità del B. In "Tigullio" le lesioni fogliari sono state molto evidenti indicando un grave danno fotosintetico, responsabile della minore crescita di questa cultivar in presenza di un eccesso di B, in accordo con Landi et al. (2013a).

La maggior tolleranza al B della varietà viola non è però dovuta ad minor accumulo di questo elemento nelle foglie, che infatti è stato addirittura superiore rispetto alla varietà a foglie verdi (**Tab. 7**). Secondo quanto riportato in precedenti studi (Landi et al., 2013a, b; Ziliani, 2013; Landi, 2014), la maggior tolleranza della varietà "Red Rubin" è da attribuirsi principalmente all'azione fotoprotettiva delle antocianine contenute nell'epidermide (effetto *sunscreen*), che riducono lo stress ossidativo attenuando la radiazione che raggiunge i cloroplasti già danneggiati dall'eccesso di B. Anche l'elevato contenuto di composti antiossidanti, come l'ascorbato e il glutathione, concorre a determinare la minore sensibilità di "Red Rubin" all'eccesso di B rispetto a "Tigullio" (Landi et al., 2013a).

Oltre a quanto appena detto, è possibile che nelle foglie di "Red Rubin" lo stress indotto dall'eccesso di B sia alleviato da un processo di redistribuzione di questo elemento dal simplasto verso l'apoplasto, come osservato in orzo da Reid e Fitzpatrick (2009).

Stato minerale

Dall'analisi della varianza non è emerso un effetto importante della concentrazione di N nella soluzione nutritiva sullo stato azotato delle piante delle due varietà di basilico (**Tab. 6**). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che, già alla concentrazione più bassa di N in soluzione (10 mM), le piante vedono soddisfatto il loro fabbisogno per questo elemento e quindi ne limitano l'assorbimento netto.

L'assenza di un effetto significativo dell'eccesso di B sulla concentrazione di N ridotto, delle piante di entrambe le varietà di basilico (**Tab. 6**) esclude che la riduzione di crescita, più marcata nella varietà a foglie verdi, sia attribuibile anche ad una carenza indotta di N. Al contrario, la riduzione del contenuto fogliare di Ca e Mg (**Tab. 9**) osservata nelle piante coltivate con 20 mg/L potrebbe avere contribuito alla riduzione di crescita provocata dall'eccesso di B.

Per valutare il contenuto di NO_3^- in base al Regolamento C.E. n.1258/2011 (v. Introduzione), le concentrazioni sono state espresse anche in mg/kg (ppm) di peso fresco. I valori sono oscillati tra 2898 ppm e 3837 ppm in "Tigullio" e tra 3322 ppm e 4900 ppm in "Red Rubin". Il contenuto di NO_3^- è stato quindi abbastanza alto, se confrontato con i limiti imposti dal regolamento, ad esempio, alle lattughe coltivate in serra nella stagione autunno-invernale (2500-5000 ppm) o alla rucola (7000 ppm).

In entrambe le varietà e in tutti e tre gli esperimenti, il contenuto di NO_3^- è stato superiore a quello rilevato da Ziliani (2013). Questo è molto probabilmente da attribuirsi alle diverse condizioni ambientali in cui sono stati condotti gli esperimenti di questa tesi e quelli di Ziliani. I nostri esperimenti, infatti, sono stati condotti in autunno invece che in primavera-estate, cioè con valori più bassi della temperatura dell'aria e della radiazione solare.

Una riduzione dell'intensità luminosa può influire sul contenuto fogliare di NO_3^- perché limita direttamente la NRA, sia a livello trascrizionale sia post-trascrizionale, e indirettamente a causa della riduzione dell'attività fotosintetica e di conseguenza della disponibilità di potere riducente (NADPH) e di scheletri carboniosi necessari per la sintesi degli aminoacidi (Bowsher et al., 1991; Lu et al., 1992; Mohr et al., 1992; Suty et al., 1993; Ali et al., 2007).

In questo studio sono emerse anche delle differenze tra le due varietà per quanto riguarda il contenuto fogliare di NO_3^- . Infatti, le piante di "Red Rubin" presentavano una concentrazione fogliare di NO_3^- superiore (+46%) rispetto a quelle di "Tigullio", mentre era inferiore quella di N ridotto, in particolare nelle foglie mediane e apicali (**Tab. 6**). Altri autori riportano un maggiore accumulo di NO_3^- nel basilico a foglie viola rispetto a quello

a foglie verdi (Majkowska-Gadomska et al., 2009; Biesiada e Kuś, 2010; Nurzyńska-Wierdak et al., 2011; Ziliani, 2013). Queste differenze potrebbero essere spiegate da diversi fattori:

- 1) Una minore attività fotosintetica di “Red Rubin” rispetto a “Tigullio”, a causa dell’effetto “*sunscreen*” degli antociani (Landi, 2014), già discusso. In effetti, in alcuni dei loro esperimenti Landi et al. (2013a) hanno osservato una minore fotosintesi netta in “Red Rubin” rispetto a “Tigullio”.
- 2) Una maggiore traslocazione di NO_3^- dalle radici alle foglie in seguito al maggior tasso di traspirazione per unità di superficie fogliare della varietà “Red Rubin”, come riportato da Ziliani (2013). Infatti la traslocazione di NO_3^- nelle foglie è legata al tasso di traspirazione al contrario di quanto avviene per lo ione NH_4^+ (Marschner, 2012).
- 3) Un minor tasso di crescita della varietà “Red Rubin” (**Tab. 5**), che ha determinato anche una riduzione del fabbisogno di proteine, e quindi di N ridotto, non controbilanciata da una riduzione dell’assorbimento radicale di NO_3^- .

Relazione fra contenuto di nitrati e attività della NRA

La letteratura riguardante la relazione tra la NRA e il contenuto di NO_3^- nei tessuti fogliari o nel mezzo di crescita è abbondante.

Alcuni autori hanno osservato che ad un aumento del contenuto endogeno di NO_3^- era associato un aumento della NRA (Aslam, et al., 1976, in foglie di orzo; Brunetti e Hageman, 1976, in grano; Chantarotwong et al., 1976, su orzo; Chen et al., 2004, in tre specie di Chenopodiacee; Meloni et al., 2004, in *Prosopis alba*). Altri autori hanno osservato invece una relazione opposta (Gniazdowska-Skoczek, 1998, in orzo; Ruiz e Romero, 1999, in melone; Rai et al., 2004, in *Ocimum tenuiflorum*; Lea et al., 2006, in *Nicotiana plumbaginifolia*; Yang et al., 2013, in anguria), cioè ad una maggiore NRA corrispondeva un minore contenuto fogliare di NO_3^- , come osservato nei nostri esperimenti quando le piante erano coltivate con 10 mM di N nella soluzione nutritiva. Altri studi hanno evidenziato un aumento della NRA all’aumentare del contenuto di NO_3^- nel mezzo di crescita (Gniazdowska-Skoczek, 1998, orzo; Zerihun e Treeby, 2002, in foglie di vite; Chen et al., 2004, in tre specie di Chenopodiacee), almeno fino ad una certa concentrazione (Zerihun e Treeby, 2002, in radici di vite; Nicodemus et al, 2008, in foglie di noce). In altri studi, infine, non si è osservato alcun tipo di relazione tra la NRA e il livello endogeno o

esogeno di NO_3^- (Aslam et al., 2001, in radici di orzo; Cedergreen e Vindbaek Madsen, 2003, in specie acquatiche).

Anche nel nostro lavoro non è emersa una chiara relazione tra la NRA (**Tab. 12**) e il contenuto di NO_3^- nella soluzione nutritiva o nei tessuti fogliari (**Tab. 6**). Alla concentrazione di 10 mM di N nella soluzione nutritiva, però, la maggiore NRA delle foglie mediane osservata in “Tigullio” rispetto all’altra varietà (**Tab. 12**) era associata ad un minor contenuto di NO_3^- e ad un maggior contenuto di N ridotto (**Tab. 6**). Questo risultato è in accordo con quanto riportato da altri autori prima citati (Gniazdowska-Skoczek, 1998; Ruiz e Romero, 1999; Rai et al., 2004; Lea et al., 2006; Yang et al., 2013). Diversamente, alla concentrazione di 20 mM di N, non si sono osservate differenze significative per quanto riguarda né la NRA né il contenuto di NO_3^- tra le due varietà.

La NRA è influenzata dall’ NO_3^- contenuto nel pool metabolico, cioè quello presente nel citosol, e non dalla quantità totale nelle cellule, che è in gran parte determinata dall’ NO_3^- contenuto nel vacuolo (Ferrari et al., 1973; Aslam et al., 1976; Aslam et al., 2001; Cookson et al., 2005). Essendo l’ NO_3^- contenuto nel citosol solo il 10% circa di quello totale (Chen et al., 2004), eventuali variazioni del livello del pool metabolico, in grado di influenzare la NRA, non sono rilevabili con il metodo di analisi utilizzato in questa tesi, che ha invece determinato il contenuto fogliare totale. Inoltre, la NRA non è regolata solo dal livello endogeno di NO_3^- (v. Cap. 2) ed è spesso difficile stabilire, per una determinata specie e/o per determinate condizioni di crescita, una stretta relazione fra la NRA e la concentrazione di NO_3^- .

Effetto del B sul metabolismo azotato

In cipolla, Inal e Tarakcioglu (2001) hanno riportato un aumento del contenuto fogliare di NO_3^- nelle piante coltivate in presenza di una concentrazione elevata di B. Al contrario, in esperimenti condotti su pomodoro, Cervilla et al. (2008) hanno osservato che una concentrazione tossica di B nel mezzo di crescita determinava un decremento del contenuto fogliare di NO_3^- .

Ziliani (2013) ha osservato un aumento del contenuto fogliare di NO_3^- nelle piante di basilico, “Tigullio” e “Red Rubin”, in presenza di 20 mg/L di B nella soluzione nutritiva, rispetto al trattamento di controllo. Questo risultato, però, non è stato confermato in questo studio. In generale, l’effetto dell’eccesso di B sul contenuto fogliare di NO_3^- è stato modesto o nullo (**Tab. 6**). D’altra parte, nei nostri esperimenti il contenuto di NO_3^- è stato molto più alto rispetto ai valori misurati da Ziliani (2013), come già discusso.

La letteratura riguardante gli effetti dell'eccesso di B sulla NRA è scarsa e abbastanza contraddittoria. Ad esempio, in grano e in orzo Mahboobi et al. (2002) hanno riscontrato una riduzione della NRA nelle piante coltivate in presenza di un eccesso di B; questa riduzione era più marcata nelle varietà più sensibili, di entrambe le specie. Un risultato simile è stato riportato da Cervilla et al. (2008) su pomodoro. Sempre su pomodoro, però, Eraslan et al. (2007a) hanno riportato un effetto opposto: cioè, l'eccesso di B aumentava la NRA. Nel loro esperimento, Eraslan et al. (2007a) hanno considerato anche il peperone; in questa specie, l'eccesso di B non ha influenzato in modo significativo la NRA.

Nel nostro studio abbiamo osservato un aumento della NRA nelle foglie delle piante coltivate in presenza di una concentrazione elevata di B, ma solo nella varietà “Red Rubin” (**Tab. 12**). Questo risultato è stato ottenuto negli esperimenti 2 e 3; nell'esperimento 1, il saggio della NRA era stato condotto solo sulle piante di “Tigullio”.

L'eccesso di B potrebbe aver agito direttamente sulla enzima oppure su uno dei numerosi fattori che ne regolano la sintesi o l'attività, come ad esempio la ripartizione dell' NO_3^- fra il pool di riserva e quello metabolico (Ferrari et al., 1973; Aslam et al., 1976; Aslam et al., 2001; Cookson et al., 2005;).

Non è chiaro se l'aumento della NRA, senza un parallelo decremento del contenuto fogliare di NO_3^- (**Tab. 6**), abbia contribuito alla maggior tolleranza al B della varietà “Red Rubin”. Nello studio già citato di Eraslan et al. (2007a) su pomodoro e peperone, l'eccesso di B determinava, parallelamente all'aumento della NRA, anche un aumento della concentrazione di prolina. Diversi lavori suggeriscono un ruolo protettivo di questo amminoacido contro gli effetti tossici del B nelle piante (Eraslan et al., 2007b; Diaz et al., 2011; Yusuf et al., 2011; Pandey Archana, 2013; Siddiqi et al., 2013). D'altra parte, in *Ocimum tenuiflorum* l'eccesso di cromo nel mezzo di crescita aumentava il contenuto di prolina ma diminuiva la NRA (Rai et al., 2004). Anche Carillo et al. (2008) hanno osservato una relazione inversa tra contenuto di prolina e NRA in piante di grano sottoposte a stress salino.

3.6 CONCLUSIONI

I dati ottenuti in questa tesi confermano la maggior tolleranza all'eccesso di B della cultivar “Red Rubin” rispetto a “Tigullio” rilevata in lavori precedenti condotti all'Università di Pisa (Landi et al., 2013a; Ziliani, 2013). La maggior tolleranza al B della varietà viola non è però dovuta al minor accumulo di questo elemento nelle foglie, che infatti è stato addirittura superiore rispetto a “Tigullio”, ma è attribuibile principalmente all'azione fotoprotettiva delle antocianine contenute nell'epidermide (effetto *sunscreen*) (Landi et al., 2013a, b; Ziliani, 2013; Landi, 2014), e all'elevato contenuto di composti antiossidanti (Landi et al., 2013a).

Non è emerso un effetto importante della concentrazione di N nella soluzione nutritiva sullo stato azotato delle piante delle due varietà di basilico. Ciò potrebbe dipendere dal fatto che già alla concentrazione più bassa di N in soluzione (10 mM) le piante vedono soddisfatto il loro fabbisogno per questo elemento e quindi ne limitano l'assorbimento netto. L'assenza di un effetto significativo dell'eccesso di B sulla concentrazione di N ridotto, delle piante di entrambe le varietà, esclude che la riduzione di crescita sia attribuibile anche una carenza indotta di N. Al contrario, il minore contenuto fogliare di Ca e Mg potrebbe spiegare, almeno in parte, la minore crescita delle piante coltivate in presenza di un eccesso di B. L'effetto dell'eccesso di B sul contenuto fogliare di NO_3^- è stato modesto o nullo.

Il contenuto fogliare di NO_3^- riscontrato in questo studio è stato superiore a quello rilevato da Ziliani (2013), molto probabilmente a causa delle diverse condizioni ambientali in cui sono state condotte le due serie di esperimenti. Le piante di “Red Rubin” presentavano una concentrazione fogliare di NO_3^- mediamente superiore (+46%) rispetto a quelle di “Tigullio”, mentre era inferiore quella di N ridotto. Questa differenza potrebbe essere spiegata da una minore attività fotosintetica di “Red Rubin” (Landi et al., 2013a), da una maggiore traslocazione di NO_3^- dalle radici alle foglie, a causa del più alto tasso di traspirazione (Ziliani, 2013), e dal un minor fabbisogno di proteine in seguito al minor tasso di crescita.

In questo studio non è emersa una chiara relazione tra la NRA e il contenuto di NO_3^- nella soluzione nutritiva e nei tessuti fogliari.

La NRA, misurata nelle foglie mediane, delle piante di “Red Rubin” trattate con l'eccesso di B è risultata maggiore rispetto ai controlli, mentre non ha mostrato variazioni in “Tigullio”. L'eccesso di B potrebbe aver agito direttamente sull'enzima oppure su uno dei

numerosi fattori che ne regolano la sintesi o l'attività (Ferrari et al., 1973; Aslam et al., 1976; Aslam et al., 2001; Cookson et al., 2005). Non è chiaro se l'aumento della NRA, abbia contribuito alla maggior tolleranza al B della varietà "Red Rubin". Per chiarire questo aspetto, sembrano necessari quindi altri studi, nei quali la NRA dovrebbe anche essere determinata a diversi orari durante il giorno, in considerazione della grande influenza esercitata sull'attività di questo enzima dalla temperatura e soprattutto dall'irradianza.

BIBLIOGRAFIA

1. Ali A., Sivakami S. and Raghuram N. (2007). Effect of Nitrate, Nitrite, Ammonium, Glutamate, Glutamine and 2-oxoglutarate on the RAN Levels and Enzyme Activities of Nitrate Reductase and Nitrite Reductase in Rice. *Physiol. Mol. Biol. Plants*; 13(1), 17-25.
2. Aslam M. and Oaks A. (1975). Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol*; 56, 634-639.
3. Aslam M., Oaks A. and Huffaker R. C. (1976). Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Physiol*, 58, 588-591.
4. Aslam M., Travis R. L. and Huffaker R. C. (1992). Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in root of uninduced and induced barley seedlings. *Plant Physiol*. 99, 1124-1133.
5. Aslam M, Travis R. L. and Huffaker R. C. (1995). Effect of pH and calcium on short-term NO_3^- fluxes in roots of barley seedlings. *Plant Physiology*; 108, 727-734.
6. Aslam M., Travis R. L., Rains D. W. and Huffaker R. C. (1996a). Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport system in roots of intact barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Planta* 200, 58-63.
7. Aslam M., Travis R. L. and Rains D. W. (1996b). Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. *Plant Physiology*; 112, 1167-1175.
8. Aslam M., Travis R. L. and Rains D. W. (2001). Enhancement of nitrate reductase activity and metabolic nitrate concentration by methionine sulfoximine in barley roots. *Plant Science*; 161, 133-142.
9. Athwal G. S., Huber J. L. and Huber S. C. (1998a). Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effect of ions, and evidence for an AMP-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiol*; 118, 1041-1048.
10. Athwal G. S., Huber J. L. and Huber S. C. (1998b). Biological significance of divalent metal ion binding to 14-3-3 proteins in relationship to nitrate reductase inactivation. *Plant Cell Physiol*; 39, 1065-1072.
11. Bachmann M., Huber J. L., Liao P. C., Gage D. A. and Huber S. C. (1996). The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Lett* 387, 127-131.
12. Bacon P. E. (1995). Nitrogen fertilization in environment. Marcel Dekker, New York.

13. Bartholomew, B. and Hill, M. J. (1984). The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food Chem.Toxicol.* 22, 789-795.
14. Bauer D., Biehler K., Fock H., Carrayol E., Hirel B., Migge A. and Becker T. W. (1997). A role of cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of nitrogen during water stress in tomato. *Physiologia Plantarum*; 99, 241-248.
15. Behr U., Wiebe H.J., (1992). Relation between photosynthesis and nitrate content of lettuce cultivars. *Sci. Hortic.*; 49, 175-179.
16. Bergsdorf E. Y., Zdebik A. A. and Jentsch T. J. (2009). Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters. *Journal of Biological Chemistry*; 284, 11184–11193.
17. Bianchini G., Pennisi M., Cioni R., Muti A., Cerbai N., Kloppmann W. (2005). Hydrochemistry of the high-boron groundwaters of the Comia aquifer (Tuscany, Italy). *Geothermics* 34, 297-319.
18. Biesiada A and Kuś A. (2010). The effect of nitrogen fertilization and irrigation on yielding and nutritional status of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 9(2) 2010, 3-12.
19. Blom-Zandstra M. (1989) Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Ann Appl Biol*; 115, 553–561.
20. Blom-Zandstra M. and Eenink A. H. (1986). Nitrate concentration and reduction in different genotypes of lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*; 111, 908-911.
21. Blom-Zandstra and Lampe J. E. M., (1985) The role of nitrate in the osmoregulation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown at different light intensities, *J. Exp. Bot.*; 36 1043–1052.
22. Bowsher C. G., Long D. M., Oaks A. and Rothstein S. J. (1991). Effect of light/dark cycle on expression on nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots. *Plant Physiol*; 95, 281-285.
23. Brambilla, G. and Martelli, A. (2007). Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. *Mutat.Res.* 635, 17-52.
24. Brown P.H, Bellaloui N., Wimmer M.A., Bassil E.S., Ruiz J., Hu H., Pfeffer H., Dannel F. and Romheld V. (2002). Boron in plant biology. *Plant Biology*; 4: 205-223.
25. Brown P.H. and Shelp B.J. (1997). Boron mobility in plants. *Plant and Soil*; 193: 85-101.
26. Brunetti N and Hageman N. H. (1976). Comparison of in Vivo and in Vitro Assays of

- Nitrate Reductase in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings. *Plant Physiol.*; 58, 583-587.
27. Campbell W. H. (1999). Nitrate reductase, structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; 50, 277-303.
 28. Canter P. H., Thomas H. and Ernst E., (2005) Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends Biotech.*; 23, 180-185.
 29. Cantliffe D. J. (1973). Nitrate accumulation in table beets and spinach as affected by nitrogen, phosphorous, and potassium nutrition and light intensity. *Agric J.*; 65:563–565.
 30. Cárdenas-Navarro R., Adamowicz S., Robin P., (1998). Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback based model. *J. Exp. Bot.*; 46, 1585-1594.
 31. Carillo P., Mastrolonardo G., Nacca F., Parisi D., Verlotta A and Fuggi A. (2008). Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Functional Plant Biology*; 35, 412-426.
 32. Carmassi G., Romani M., Diara C., Massa D, Maggini R., Incrocci L and Pardossi A. (2013). Response to sodium chloride salinity and excess boron in greenhouse tomato grown in semi-closed substrate culture in a mediterranean climate. *Journal of Plant Nutrition*; 36(7): 1025-1042.
 33. Cassens, R. (1995). Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food 'echnol.* 50(7), 72-80, 115.
 34. Cataldo D.A., Haroon M., Sehrader L.E., Youngs V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by titration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant. Annal*; 6: 71-80.
 35. Causin H. F. and Barneix A. J. (1993). Regulation of NH_4^+ uptake in young wheat plants: Effect of root ammonium concentration and amino acids. *Plant and Soil*; 151, 211-218.
 36. Cedergreen N. and Madsen T. V. (2003). Nitrate reductase activity in roots and shoots of aquatic macrophytes. *Acquatic Botany*; 76, 203-212.
 37. Cervilla L.M., Blasco B., Rios J.J., Romero L., Ruiz J.M. (2007). Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* 100: 747-756.

38. Cervilla L.M., Blasco B., Rios J.J., Rosales M.A., Rubio-Wilhelmi M.M., Sánchez-Rodríguez, Romero L. and Ruiz J. M. (2008). Response of nitrogen metabolism to boron toxicity in tomato plants. *Plant Biology*; 11 (2009), 671-677.
39. Chang A. C., Yang T. Y. and Riskowski G. L. (2013). Change in nitrate and nitrite concentrations over 24h for sweet basil and scallions. *Food Chemistry*; 136, 955-960.
40. Chapin F. S. III, Moilanen L. and Kielland K. (1993). Preferential use of organic nitrogen for growth by non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature* 361, 150-153.
41. Chantarotwong W., Huffaker R. C., Miller B. L., Granstedt R. C. (1976). *In Vivo* Nitrate Reduction in Relation to Nitrate Uptake, Nitrate Content, and *in Vitro* Nitrate Reductase Activity in Intact Barley Seedlings. *Plant Physiol.*; 57, 519-522
42. Chen B.-M., Wang Z.-H., Li S.-X., Wang G.-X., Song H.-X. and Wang X.-N. (2004). Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*; 167, 635-643.
43. Cheng C. L., Acedo G. N., Cristins M. and Conkling M. A. (1992). Sucrose mimic the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89, 1861-1864.
44. Chopin F., Orsel M., Dorbe M. F., Chardon F., Truong H. N., Miller A. J., Krapp A. and Daniel-Vedele F. (2007). The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *The Plant Cell*; 19, 1590–1602.
45. Chopra R. K. (1983) Effects of temperature on the *in vivo* assay of nitrate reductase in some C3 and C4 species. *Ann. Bot.*; 51, 617-620
46. Cookson S. J., Williams L. E. and Miller A. J. (2005). Light-Dark Changes in Cytosolic Nitrate Pools Depend on Nitrate Reductase Activity in *Arabidopsis* Leaf Cells. *Plant Physiology*; 138, 1097–1105.
47. Corré W. J. and Breimer T. (1979). Nitrate and nitrite in vegetables. Pudoc, Wageningen, p 85.
48. Cortas, N.K. and Wakid, N.W. (1991). Pharmacokinetic aspects of inorganic nitrate ingestion in man. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 192-195.
49. Daneshian A., Gurbuz B., Cosge B. and Ipek A. (2009). Chemical components of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown at different nitrogen levels. *IJNES*; 3 (3), 8-12.
50. De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J. M., Thomine S., Gambale F. and Barbier-Brygoo H. (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates

- nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*; 442, 939-942.
51. Dennis M. J. and Wilson L. A. (2003). Nitrates and Nitrites. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, (2nd ed). UK; Elsevier B. V. (pp. 4136-4141).
 52. Derolez J. and Vulsteke G. (1985). Accumulation of nitrate: a cultivar-linked property with celeriac (*Apium graveolens* L.var. *rapaceum*). *Plant Foods for Human Nutrition*; 35, 375-378.
 53. Devienne F., Mary B. and Lamaze T. (1994). Nitrate transport in intact wheat roots, II. Long-term effect of NO₃⁻ concentration in the nutrient solution on NO₃⁻ unidirectional fluxes and distribution within the tissues. *J. Exp. Bot.*; 45, 677-684.
 54. Dhyr-Jensen K. and Brix H. (1996). Effect of pH on ammonium uptake by *Typha latifolia* L. *Plant Cell Environ.*; 19, 1431-1436.
 55. Diaz M., Bastias E., Pacheco P., Tapia L., Martinez-Ballesta M.C., Carvajal M. (2011). Characterization of the physiological response of the highly-tolerant tomato cv. 'Poncho Negro' to salinity and excess boron. *Journal of Plant Nutrition*; 34, 1254-1267.
 56. Doddema H. and Otten G. P. (1979). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. III. Regulation. *Physiologia Plantarum*; 45, 339-346.
 57. Doddema H. and Telkamp G. P. (1979). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol. Plant.* 45, 332-338.
 58. Duncan C., Dougall H., Johnston P., Greens S., Brogan R., Leifert C., Smith L., Golden M. and Benjamin N. (1995). Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of the dietary nitrate. *Nature Med* 1:546–551.
 59. EC (European Commission), Commission Regulation (EC) (1999) No 864/99 of 26 April 1999 amending Regulation (EC) No. 194/97 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official J Eur Commun* L108:16–18.
 60. EC (European Commission), Commission Regulation (EC) (2001) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official J Eur Commun* L77:1–13.
 61. EC (European Commission), Commission Regulation (EC) (2002) No 563/2002 of 2 April 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official J Eur Commun* L86:5–6.
 62. EC (European Commission), Commission Regulation (EC) (2004) No. 655/2004 of 7 April 2004 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards nitrate in foods for

- infants and young children. *Official J Eur Commun* L104:48–49.
63. EC (European Commission), Commission Regulation (EC) (2006) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official J Eur Commun* L364:5.
 64. EC (European Commission), Commission Regulation (EC) (2011) No. 1258/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards maximum levels for nitrates in foodstuffs. *Official J Eur Commun* L320:15.
 65. EFSA (2008). Nitrate in vegetables Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA Journal*, 689, 1-79.
 66. Elia A., Gonnella M., Magnifico V., Santamaria P., (1997). Diurnal variation of nitrate accumulation in broccoli rab leaves. *Agr. Med.*; 127, 233-240.
 67. Ellen, G., Schuller, P.L., Bruijns, E., Froeling, P.G. and Baadenhuijsen, H.U. (1982). Volatile Nnitrosamines, nitrate and nitrite in urine and saliva of healthy volunteers after administration of large amounts of nitrate. *IARC Sci.Publ.* 365-378.
 68. Eraslan F., Inal A., Gunes A. and Alpaslan M. (2007a). Boron toxicity alters nitrate reductase activity, proline accumulation, membrane permeability, and mineral constituents of tomato and pepper plants. *Journal of Plant Nutrition* 30, 981-994.
 69. Eraslan F., Inal A., Savasturk O. and Gunes A. (2007b). Change in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturæ*; 114, 5-10.
 70. Ferrari T. E., Yoder D. and Filner D. (1973). Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: evidence for two nitrate pools. *Plant Physiol*; 51, 423-431.
 71. Fido R. J. (1991). Isolation and partial amino acid sequence of domains of nitrate reductase from spinach. *Phytochemistry*; 30, 3519-3523.
 72. Forde B. G. (2002). Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu Rev Plant Biol*; 53, 203-224.
 73. Forde B. J. and Cullimore J. V. (1989). The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. In: Mifflin B. J. (eds) *Oxford surveys of plant molecular biology*, vol. 6. Oxford University Press, Oxford, pp 247-296.
 74. Fritsch, P., de Saint,Blanquat.G. and Klein, D. (1985). Excretion of nitrates and nitrites in saliva and bile in the dog. *Food Chem.Toxicol.* 23, 655-659.
 75. Galangau F., Daniel-Vedele F., Moureaux T., Dorbe M.-F., Leydecker M.-T. and Caboche M. (1988). Expression of leaf nitrate reductase gene from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol*; 88, 383-388.

76. Galloway, B.A., Monks, D.W. and Schultheis, J.R. (1996). Effect of Herbicides on Pepper Transplants Produced Using Various Irrigation Systems. *Dept. of Horticultural Science, North Carolina University, Raleigh, NC*, pp. 323-332.
77. Gangolli S., Van den Brandt P., Feron V., Janz-wsky C., Koeman J., Speijers G., Speigelhalder B., Walker R. and Winshnok J. (1994). Assessment of nitrate, nitrite, and N-nitroso-compounds. *Europ. J.Pharmacol. Environ. 'otoxicol.-Pharmacol. Sec.* 292, 1-38.
78. Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D. and Pugin A. (2006). Early signalling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant–Microbe Interactions*; 19, 711–724.
79. Glaab J. and Kiser W. M. (1995). Inactivation of nitrate reductase involves NR-protein phosphorylation and subsequent “binding” of a inhibitor protein. *Planta*; 195, 514-518.
80. Glass A. D. M., Shaff J. E. and Kochian L. V. (1992). Studies of uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Phisiol.* 99, 456-463.
81. Gniazdowska-Skoczek H. (1998). Effect of light and nitrates on nitrate reductase activity and stability in seedling leaves of selected barley genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*; 20 (2), 155-160.
82. Golcz A., Politycka B. and Seidler-Łożykowska K. (2006). The effects of nitrogen fertilization and stage of plant development on the mass and quality of sweet basil leaves. (*Ocimum basilicum* L.). *Herbal Pol.*; 52, 1/2, 22-30.
83. Gupta U.C., Jame Y. W., Campbell C. A., Leyshon A. J. and Nicholaichuk W. (1985). Boron Toxicity and Deficiency - a Review. *Canadian Journal of Soil Science*; 65: 381-409.
84. Gutezeit B. ; Fink M. (1999). Effect of cultivar and harvest date on nitrate content of carrot roots. *Journal of horticultural science & biotechnology*; 74, 297-300.
85. Hare P. D. and Cress W. A. (1997). Metabolic implication of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*; 21, 79-102.
86. Haynes R. J. (1986). Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In *Mineral nitrogen in plant-soil system*. Ed. R. J. Haynes. pp. 303-378. Academi Press, San Diego.
87. Heldt H-W (in cooperation with Fione Heldt) (2005). Plant Biochemistry. David Cella (ed). Elsevier Acadeic Press. USA.
88. Hirel B. and Lea P. J. (2001). Ammonia Assimilation. In *Plant nitrogen*. Peter J. Lea J.-F. Morot-Gaudry.(Eds). pp. 38-59. Springer, INRA editions.

89. Hoarau J., Nato A., Lavergne D., Flipo V. and Hirel B. (1991). Nitrate reductase activity changes during a culture cycle of tobacco cells: the participation of a membrane-bound form enzyme. *Plant Sci.*; 79, 193-204.
90. Hole D. J., Emran A. M., Fares Y and Drew M. C. (1990). Induction of nitrate transport in maize root, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiol.* 93, 642-647.
91. Hobbs D.A., Kaffa N., George T.W., Methven L. and Lovegrove J.A., (2012). Blood pressure-lowering effects of beet root juice and novel beetroot-enriched bread products in normotensive male subjects. *Br J Nutr.*, 14, 1-9.
92. Huber S. C. and Kaiser W. M. (1997). Correlation between apparent activation state of nitrate reductase (NR), NR hysteresis and degradation of NR protein. *J Exp Bot*; 132, 1367-1374.
93. Inal A. and Tarakcioglu C. (2001). Effects of nitrogen forms on growth, nitrate accumulation, membrane permeability, and nitrogen use efficiency of hydroponically grown bunch onion under boron deficiency and toxicity. *Journal of Plant Nutrition*; 24, 1521-1534.
94. Ishii T., Matsunaga T., Hayashi N. (2001). Formation of rhamnogalacturonan II - borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. *Plant. Physiol.* 126: 1698-1705.
95. Jackson W. A., Flesher D. and Hageman R. H. (1973). Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings: some characteristic of apparent induction. *Plant Physiol.* 51, 120-157.
96. Kacar B. (1972). Chemical analysis of plant and soil. *University of Ankara, Ankara.*
97. Kaiser W. M. and Brendle-Behnisch E. (1991). Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. II In vitro modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol*; 96, 368-375.
98. Kanamara K., Wang R., Su W and Crawford N. M. (1999). Ser-534 in the hinge 1 region of Arabidopsis nitrate reductase is conditionally required for binding of 14-3-3 proteins and *in vitro* inhibition. *J Biol Chem*; 274, 4160-4165.
99. Katyal J.C., Randhawa N.S. (1983). Micronutrients. *FAO, Fertilizer and plant nutrition. Bulletin* No. 7.
100. King B. J., Siddiqi M. Y., Ruth T. J., Warner R. L. and Glass A. D. M. (1993). Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiol.* 102, 1279-1286.
101. Kleinhofs A. and Warner R. L. (1990). Advances in nitrate assimilation. In: Mifflin

- B.J., Lea P.J. (eds) *The biochemistry of plants*. Academic Press, San Diego, pp 89-120.
102. Knobeloch L., Salna B., Hogan A., Postle J. and Anderson H. (2000). Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environ Health Perspect* 108:675–678.
 103. Kortboyer, J.M., Olilling, M., Zeilmaier, M.J., Slob, W., Boink, A.B.T.J., Schothorst, R.C., Sips, A.J.A.M. and Meulenbelt, J. (1997). The oral bioavailability of sodium nitrite investigated in healthy adult volunteers. Report No. 235802007 from the National Institute of Public Health and Environment (RIVM), Bilthoven, Netherlands.
 104. Kot S.F. (2008). Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Reviews Environ. Sci. Biotechn.*; 8(1): 3-28.
 105. Krebs M, Beyhl D, Gorlich E, Al-Rasheid KA, Marten I, Stierhof YD, Hedrich R, Schumacher K. 2010. Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; 107, 3251–3256.
 106. Kronzucker H. J., Siddiqi M. Y. and Glass A. D. M. (1997). Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385, 59-61.
 107. Kunze M., Riedel J., Lange U., Hurwitz R. and Tischner R. (1997). Evidence for the presence of GPI-anchored PM-NR in leaves of *Beta vulgaris* and for PM-NR in barley leaves. *Plant Physiol Biochem*; 35, 507-512
 108. La Comba B. (2006). Rimozione di microinquinanti inorganici naturali nelle acque destinate al consumo umano. Esperienza per la rimozione del boro con scambio ionico su impianto pilota.
http://www.gestioneacqua.it/formazione/acos_2006_lacomba_asa2.pdf
 109. Lainé P., Ourry A. and Boucaud J. (1995). Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: Effect of localized nitrate supply. *Planta*; 196, 77-83.
 110. Lainé P., Ourry A., Macduff J., Boucaud J. and Salette J. (1993). Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum*; 88, 85–92.
 111. Landi M. (2014). Can anthocyanins photoprotect purple genotypes of *Ocimum basilicum* L. against boron toxicity and high light?. TESI DI DOTTORATO. *Università di Pisa*.
 112. Landi M., Pardossi A., Remorini D., Giudi L. (2013a). Antioxidant and photosynthetic response of purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) to boron excess. *Environmental and Experimental Botany* 85, 64-75.

- 113.Landi M., Remorini D., Pardossi A., Giudi L. (2013b). Sweet basil (*Ocimum basilicum*) with green or purple leaves: which differences occur in photosynthesis under boron toxicity?. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, in press. doi: 10.1002/jpln.201200626.
- 114.Larsen F.J., Schiffer T.A., Borniquel S., SahlinK., Ekblom B., Lundberg J.O. and Weitzberg E. (2011). Dietaryinorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab.*, 13, 149–159.
- 115.Larsson C. M. and Ingemarsson B. (1989). Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. In *Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*. Eds. J. R. Kinghorn and J. L. Wray. pp. 4-14. Oxford Science Publ., New York.
- 116.Lea P. J. and Ireland R. I. (1999). Nitrogen metabolism in higher plants. In: Singh BK (ed) *Plant amino acids*. Marcel Dekker, New York, pp 1-47.
- 117.Lea U. S., Leydecker M.-T., Quilleré I., Meyer C., and Lillo C. (2006). Posttranslational Regulation of Nitrate Reductase Strongly Affects the levels of Free Amino Acids and Nitrate, whereas Transcriptional Regulation Has Only Minor Influence. *Plant Physiology*; 140, 1085-1094.
- 118.Lea P. J. and Mifflin B. J. (1974). An alternative route for nitrogen assimilation in plants. *Nature*; 251, 680-685.
- 119.Lea P. J., Robinson S. A. and Stewart G. R. (1990). The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: Mifflin B. J., Lea P. J. (eds) *The biochemistry of plants, vol 16 Intermediary nitrogen metabolism*. Academy Press, New York, pp 147-152.
- 120.Lee S. and Arnoff S. (1967). Boron in plants. A biochemical role. *Science*; 158: 798-799.
- 121.Lee R. B., Purves J. V., Ratcliff R. G. and Saker L. R. (1992). Nitrogen assimilation and control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. *J. Exp. Bot.* 43, 1385-1396.
- 122.Lejay L., Gansel X., Cerezo M., Tillard P., Muller C., Krapp A., von Wiren N., Daniel-Vedele F., Gojon A. (2003). Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell*; 15, 2218-2232.
- 123.Lillo C. (2008). Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochem J*, 415, 11-19.
- 124.Lillo C., Kazazaic S., Ruoff P. and Meyer C. (1997). Characterization of Nitrate

- Reductase from Light- and Dark-Exposed Leaves (Comparison of Different Species and Effects of 14-3-3 Inhibitor Proteins). *Plant Physiology*; 114, 1377-1383.
- 125.Lillo C., Meyer C., Lea U. S., Provan F., Olstedal S. (2004). Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *J. Exp. Bot.*; 55, 1275-1282.
 - 126.Lijinsky W. and Epstein S.S., (1970) Nitrosamines are environmental carcinogens, *Nature* 225, 21.
 - 127.Lorenz O. (1978). Potential nitrate levels in edible plants. In D. Neilson and J. Mac Donald (Eds). *Nitrogen in the environment. Soil-Plant-Nitrogen Relationship* (2, pp 201-219). New York: Academic Press.
 - 128.Loughrin, J. H., & Kasperbauer, M. J. (2001). Light reflected from colored mulches affects aroma and phenolic content of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49, 1331–1335.
 - 129.Loulakakis K. A. and Roubelakis-Angelakis K. A. (1996). The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic activities. *Physiol Plant*; 96, 29-35.
 - 130.Lu J. L., Ertl J. R. and Chen C. M. (1992) Transcriptional regulation of nitrate reductase messenger RNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol*; 98, 1255-1260.
 - 131.Lundberg J. O., Weitzberg E., Cole J.A. and Benjamin N. (2004). Nitrate, bacteria and human health. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 593-602.
 - 132.Lundberg J. O., Weitzberg E. and Gladwin M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 156-167.
 - 133.Macduff J. H. and Jackson S. B. (1992). Influx and efflux of nitrate and ammonium in italian ryegrass and white clover roots: comparisons between effects of darkness and defoliation. *Journal of Experimental Botany*; 43, 525–535.
 - 134.MacFarlane J. J. and Smith F. A. (1982). Uptake of methylamine by *Ulva rigida*: Transport of cations and diffusion of free base. *J. Exp. Bot.*; 33, 195-207.
 - 135.MacKintosh C. (1992). Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*; 1137, 121-126.
 - 136.MacKintosh C., Douglas P. and Lillo C. (1995). Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spianacea oleracea*) leaves. *Plant Physiol*; 107, 451-457.

137. MacKown C. T. and McClure P. R. (1988). Development of accelerated net nitrate uptake. *Plant Physiol.* 87, 162-166.
138. Majkowska-Gadomska J., Arcichowska K. and Wierzbicka B. (2009). Nitrate content of the edible parts of vegetables and spice plants. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*; 8(3), 25-35.
139. Malorgio F., Pardossi A., Casarotti D., Tognoni F. (1995) Contenuto di nitrati nella lattuga coltivata in NFT. *Colture Protette*; 25 (7/8), 67-70.
140. Mahboobi H., Yücel M and Öktem H. A. (2002). Nitrate Reductase and Glutamate Dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity. *Journal of Plant Nutrition*; 25(8), 1829-1837.
141. Marschner H. (1995). Mineral nutrition in higher plants. *Academic Press, London, UK*. 889 p.
142. Marschner P. (2012). Mineral Nutrition of Higher Plants. *Academic Press*, Volume 89, Volume 95; 651 pagine.
143. Masoni A. (2010). Direttiva nitrati. In: *Riduzione dell'inquinamento delle acque dai nitrati provenienti dall'agricoltura*. Felici Editore S.r.l., pp. 1-23.
144. Maynard D. N., Baker A. V., Minotti P. L. and Peck N. H. (1976). Nitrate accumulation in vegetables. *Adv Agron*; 28, 71–118.
145. McClure P. R., Kochian L. V., Spanswick R. M. and Shaff J. E. (1990). Evidence from cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on membrane potential. *Plant Physiol.* 93, 281-289.
146. McIntyre G.I., (1997). The role of nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. *Austr. J. Plant Physiol.*; 24, 103-118.
147. McKnight G. M., Duncan C. W., Leifert C. and Golden M. H. (1999). Dietary nitrate in man: friend or foe? *Br J Nutr* 81:349–358.
148. McKnight, G., Smith, L.M., Drummond, R.S., Duncan, C.W., Goldem, M.N.H. and Benjamin, N. (1997). The chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in man. *Gut*, 40, 211 – 214.
149. McNally S. F. and Hirel B. (1983) Glutamine synthetase isoform in higher plants. *Physiol Veg*; 21, 761-774.
150. Meah M. N., Harrison N. and Davis A. (1994). Nitrate and nitrite in foods and the diet. *Food Add Contam*; 11, 519–532.
151. Meloni D. A., Gulotta M. R., Martinez C. A. and Oliva M. A. (2004). The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in

- Prosopis alba*. *Braz. J. Plant Physiol.*; 16(1), 39-46.
152. Mensinga T. T., Speijers G. J. A. and Meulenbelt J. (2003). Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol Rev* 22:41–51.
 153. Meyer C. and Stitt M. (2001). Nitrate Reduction and signalling. In *Plant nitrogen*. Peter J. Lea J.-F. Morot-Gaudry.(Eds). pp. 38-59. Springer, INRA editions.
 154. Miceli A., Moncada A., Vetrano F. and D'Anna F. (2003). First results on yield and quality response of basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in a floating system. *Acta Hort.*; 609, 377-381.
 155. Miflin B. J. (1974). The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. *Plant Physiol.*; 54, 550-555.
 156. Miflin B. J. and Lea P. J. (1976). The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*; 15, 873-885.
 157. Migge A., Meya G., Carrayol E., Hirel B. and Becker T. W: (1996). Regulation of subunits composition of tomato plastidic glutamine synthetase by light and the nitrogen source. *Planta*; 200, 213-220.
 158. Miller A. J., Fan X., Orsel M., Smith S. J. and Wells D. M. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58, 2297–2306.
 159. Miller A. J, Smith S. J. (1992). The mechanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. *Planta*; 187, 554–557.
 160. Miller A. J. and Smith S. J. (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal roots cells. *J. Exp. Bot.*; 47, 843-854.
 161. Miller A. J, Smith S. J. (2008). Cytosolic nitrate ion homeostasis, could it have a role in sensing nitrogen status? *Annals of Botany*; 101, 485–489.
 162. Miwa K., Takano J., Omori H., Seki M., Shinozaki K. and Fujiwara T. (2007). Plants tolerant of high boron levels. *Science*; 318: 1417-1417.
 163. Mohr H., Neiningner A. and Seith B. (1992). Control of nitrate reductase and nitrite reductase gene expression by light, nitrate and a plastic factor. *Bot Acta*; 105, 81-89.
 164. Moorhead G., Douglas P., Morrice N., Scarabel M., Aitken A. and MacKintosh C. (1996). Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr Biol*; 6, 1104-1113.
 165. Muller B. and Touraine B. (1992). Inhibition of NO₃⁻ uptake by various phloem-traslocated amino acids in soybeen seedlings. *J. Exp. Bot.* 41, 221-241.
 166. Nable R.O., Bañuelos G.S. and Paull J.G., (1997). Boron toxicity. *Plant Soil*; 193: 181-198.

167. Nannipieri P. and Perucci P. (2003). L'azoto nel sistema suolo-pianta. In *Biochimica agraria*. Pàtron Editore. Bologna. pp. 785-813.
168. Nicodemus M. A., Francis Salifu K. and Jacobs D. F. (2008). Nitrate reductase activity and nitrogen compounds in xylem exudate of *Juglans nigra* seedlings: relation to nitrogen source and supply. *Trees*; 22, 685–695.
169. Noguchi K., Dannel F., Pfeiffer H., Romheld V., Hayashi H. and Fujiwara T. (2000). Defect in root-shoot translocation of boron in *Arabidopsis thaliana* mutant bor1-1. *Journal of Plant Physiology*; 156: 751-755.
170. Nurzyńska-Wierdak R., Borowski B. and Dzida K. (2011). Yield and chemical composition of basil herb depending on cultivar and foliar feeding with nitrogen. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*; 10(1), 207-219.
171. Oaks A. and Hirel B. (1985). Nitrogen assimilation in roots. *Annu Rev Plant Physiol*; 36, 345-365.
172. Olsen S.R., Sommers E.L. (1982). Phosphorus. *Methods of soil analysis, 2nd edition, American society of agronomy, USA*.
173. Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. (1982). Chemical and microbiological proprieties. *Methods of soil analysis, 2nd edition, American society of agronomy, USA*.
174. Pandey Archana N. (2013). Antioxidant responses and water status in Brassica seedlings subjected to boron stress. *Acta Physiologiae Plantarum*; 35, 697-706.
175. Pannala A. S., Mani A. R., Spencer J. P. E., Skinner V., Bruckdorfer K. R., Moore K. P. and Rice-Evans C. A. (2003). The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Rad Biol Med* 34:576–584.
176. Pardossi A., Malorgio F., Incrocci L., Tognoni F., (2006) Hydroponic technologies for greenhouse crops, In: Dris R., (Ed.), *Crops: Quality, Growth and Biotechnology*, WFL Publisher, Helsinki, 23, 360-378.
177. Parslow R. C., McKinney P. A., Law G. R., Staines A., Williams R. and Bodansky H. J., Incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, Northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis. *Diabetologia* 40:550–556.
178. Pate J. S. (1973). Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol Biochem*; 5, 109–119.
179. Patruno A. (1987). Dilavamento dell'azoto nitrico e perdita nelle acque di drenaggio. *Irrigazione Drenaggio*, 34 (1), 37-43.
180. Pérez-García A., Pereira S., Pissara J., García-Gutiérrez A., Cazorla F. M., Salema R.,

- de Vicente A. and Canova F. M. (1998). Cytosolic localization in tomato cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta*; 206, 426-4334.
181. Pérez-Rodríguez J. and Valpuesta V. (1996). Expression of glutamine synthetase genes during natural senescence of tomato leaves. *Physiol Plant*; 97, 576-582.
182. Pimpini F., Filippini M.F., Sambo P., Gianquinto G., (2000). Influenza della concimazione sul contenuto di nitrato in due tipi di radicchio rosso. *Riv. Agron*; 34, 406-418.
183. Plitycka B. and Golcz A. (2004). Content of chloroplast pigments and anthocyanins in the leaves of *Ocimum basilicum* L. depending of nitrogen doses. *Folia Hort. Ann.* 16/1, 23-29.
184. Politycka B. and Golcz A. (2004). Content of chloroplast pigments and anthocyanins in the leaves of *Ocimum basilicum* L. depending on nitrogen doses. *Folia Horticulturae*; 16/1, 23-29.
185. Privalle L. S., Lahners K. N., Mullins M. A. and Rothstein S. (1989) Nitrate effects on nitrate reductase activity and nitrite reductase mRNA levels in maize suspension cultures. *Plant Physiol.*; 90, 962-967.
186. Quinche J.P., Dvorak V., (1980). Le dosage des nitrates dans les légumes, les plantes condimentaires et les terres pour ionométric et par chromatographic gaz-liquide. *Rev. Suisse Vit. Arb. Hort.*; 12 (1), 7-19.
187. Rai V., Vajpayee P., Singh S. N. and Mehrotra S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defence system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science*; 167, 1159-1169.
188. Rawat S. R., Silim S. N., Kronzuckerr H. J., Siddiqi M. Y. and Glass A. D. M. (1999) *AtAMT1* gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant. J.*; 19, 143-152.
189. Redingbaugh M. G. and Campbell W. H. (1985). Quaternary structure and composition of squash NADH:nitrate reductase. *J. Biol. Chem.*; 260, 3380-3385.
190. Reid R.J., Hayes J.E., Post A., Stangoulis J.C.R., Graham R.D. (2004). A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, cell and environment*; 25: 1405-1414.
191. Reinink K., Groenwold R. and Bootsma A. (1987). Genotypical differences in nitrate content in *Lactuca sativa* L. and related species and correlation with dry matter

- content. *Euphytica*; 36, 11-18.
- 192.Reinink K., van Nes M. and Groenwold R. (1994). Genetic variation for nitrate content between cultivars of endive (*Cichorium endiviae* L.). *Euphytica*; 75, 41-48.
 - 193.Rice-Evans, C. A., Miller, J. N., & Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*; 20, 933–956.
 - 194.Rideout J. W., Chaillou S., Raper C. D. and Morot-Gaudry J.-F. (1994). Ammonium and nitrate uptake by soybean during recovery from nitrogen deprivation. *J. Exp. Bot.*; 45, 23-33.
 - 195.Ruiz J. M. and Romero L. (1999). Nitrogen efficiency and metabolism in grafted melon plants. *Scientia Horticulturae*; 81, 113-123.
 - 196.Sakakibara H., Takei K. and Sugiyama T. (1996). Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize uroporphyrinogen III methyltransferase, an enzyme involved in the synthesis of siroheme, which is a prosthetic group of nitrite reductase. *Plant J.*; 10, 883-892.
 - 197.Santamaria P. (1997). Contributo degli ortaggi all’assunzione giornaliera di nitrato, nitrito e nitrosammine. *Industrie Alimentari*; 36:1329–1334.
 - 198.Santamaria P. (2006). Review, Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J Sci Food Agric* 86, 10–17.
 - 199.Santamaria P., Elia A. and Gonnella M. (1997). Changes in nitrate accumulation and growth of endive plants during the light period as affected by nitrogen level and form. *J Plant Nutr* 20:1255–1266.
 - 200.Santamaria P., Elia A., Gonnella M., Parente A. and Serio F. (2001) Ways of reducing rocket salad nitrate content. *Acta Horti*; 548, 529–537.
 - 201.Santamaria P, Elia A, Parente A and Serio F, (1998) Fertilization strategies for lowering nitrate content in leafy vegetables chicory and rocket salad cases. *J Plant Nutr* 21:1791–1803.
 - 202.Santamaria P., Elia A., Serio F. and Todaro E. (1999). A survey of nitrate and oxalate content in retail fresh vegetables. *J Sci Food Agric*; 79, 1882–1888.
 - 203.Sasakawa H. and Yamamoto Y., (1978). Comparison of the uotake of nitrate and ammonium by rice seedlings – influence of light, temperature, oxygen concentration, oxogenous sucrose, and metabolic inhibitors. *Plant Physiol.* 62, 665-669.
 - 204.SCF (Scientific Committee on Food), (1992). *Opinion on nitrate and nitrite, expressed on 19 October 1990 (26th series)*, ed by European Commission, Brussels, pp 23–32.

- 205.SCF (Scientific Committee on Food), (1995). *Opinion on nitrate and nitrite, expressed on 22 September 1995 (Annex 4 to Document III/5611/95)*, ed by European Commission, Brussels, p 20.
- 206.SCF (Scientific Committee on Food), (1997). Assessment of dietary intake of nitrates by the population in the European Union, as a consequence of the consumption of vegetables, in *Reports on tasks for scientific cooperation: report of experts participating in Task 3.2.3*, ed by European Commission, Brussels, p 34.
- 207.Schlee J. and Komor E. (1986). Ammonium uptake by *Chlorella*. *Planta* 168, 232-238.
- 208.Sechley K. A., Yamaya T. and Oaks A. (1992). Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int Rev Cytol*; 134: 85-163.
- 209.Seidler-Łożykowska K., Mordalski R., Kncharski W., Golcz A., Kozik E. and Wójcik J. (2009). Economic and qualitative value of the raw material of chosen species of medicinal plants from organic farming part II. Yield and quality of sweet basil herb (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Sci. Pol., Agricultura* 8(3) 2009, 29-35.
- 210.Sgherri C., Cosi E., & Navari-Izzo F. (2003). Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum*; 118, 21–28.
- 211.Shankar N. and Srivastava H. S. (1998). Effect of glutamine supply on nitrate reductase isoforms in maize seedlings. *Phytochem.*; 47, 701-706.
- 212.Sharma P.N. and Ramachandra T. (1990). Water relations and photosynthesis in mustard plant subject to boron deficiency. *Indian J. Plant Physiol*;. 33: 150-154.
- 213.Siddiqi M. H., Al-Whaibi M. H., Sakran A. M., Ali H. M., Basalah M. O., Faisal M., Alatar A. and Al-Amri A. A. (2013). Calcium-Induced Amelioration of Boron Toxicity in Radish. *Journal of Plant Growth Regulation*; 32, 61-71.
- 214.Siddiqi M. Y., Glass A. D. M., Ruth T. J. and Rufty T. W. Jr. (1990). Studies of the Uptake of Nitrate in Barley. I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ Influx. *Plant Physiology*; 93, 1426-1432.
- 215.Siegel L. M. and Wilkerson J. O. (1989). Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. In Wray J. L., Kinghorn J. R. (eds) *Molecular and genetics aspects of nitrate assimilation*. Oxford Science Publ, Oxford, pp 263-283.
- 216.Sivasankar S. and Oaks A. (1996). Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol Biochem* 34, 609-620.
- 217.Solomonson L. P. and Barber M. J. (1990). Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; 41, 225-253.

218. Speijers G. J. A. (1996a). Nitrate, in *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food*, ed by World Health Organization, Food Additives Series 35, Geneva, pp 325–360.
219. Speijers G. J. A. (1996b). Nitrate (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). In: *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food*, ed by World Health Organization, Food Additives Series 35, Geneva, pp 325–360.
220. Speijers G. J. A. and van den Brandt P. A. (2003a). *Nitrate (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds)*. [Online]. WHO Food Additives Series 50. Available: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je06.htm> [21 July 2004].
221. Speijers G. J. A. and van den Brandt P. A. (2003b). *Nitrite (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds)*. [Online]. WHO Food Additives Series 50. Available: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je05.htm> [21 July 2004].
222. Speijers, G.J.A., Van Went., G.F, Van Apeldoorn., M.E, Montizaan., G.K, Janus., J.A, Canton., J.H, Van Gestel., G.A.M, Van der Heijden., C.A, Heijna-Merkus., E, Knapp., A.G.A.C, Luttick, R and de Zwart, D (1987) Integrated Criteria document Nitrate Effects. Appendix to RIVM report No. 758473007. Bilthoven
223. Spiegelhalder B., Eisenbrand G. and Preussmann R. (1976). Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol* 14:545–548.
224. Steingröver E., Ratering P., Siesling J., (1986a). Daily changes in uptake, reduction and storage of nitrate in spinach grown at low light intensity. *Physiol. Plant.*; 66, 550-556.
225. Steingröver E., Siesling J., Ratering P., (1986b). Effect on one night with “low light” on uptake, reduction and storage of nitrate in spinach. *Physiol. Plant.*; 66, 557-562.
226. Streit L., Martin B. A. and Harper J. E. (1987). A method for the separation and purification of the three forms of nitrate reductase present in wild-type soybean leaves. *Plant Physiol*; 84, 654-657.
227. Strahm B. D. and Harrison R. B. (2006). Nitrate sorption in a variable-charge forest soil of the Pacific Northwest. *Soil Science* 171, 313–321.
228. Sutton T., Baumann U., Hayes J., Collins N. C., Shi B. J., Schnurbusch T., Hay A, Mayo G., Pallotta M., Tester M. and Langridge P. (2007). Boron-toxicity tolerance in

- barley arising from efflux transporter amplification. *Science*; 318: 1446-1449.
- 229.Suty L., Moureaux T., Leydecker M. T. and Delaserve B. T. (1993). Cytikinin affects nitrate reductase expression through the modulation of polyadenylation of the nitrate reductase messenger RNA transcript. *Plant Sci*; 90, 11-19.
- 230.Suzuki A., Oaks A., Jacquot J. P., Vidal J. and Gadal P. (1985). An electron transport system in maize roots for reaction of glutamate synthase and nitrite reductase. *Plant Physiol*; 78, 374-378.
- 231.Takano J., Miwa K. and Fujiwara T. (2008). Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in Plant Science* 13: 451-457.
- 232.Tanaka M. and Fujiwara T. (2008). Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*; 456: 671-677.
- 233.Temple S. J., Vance C. P. and Gantt J. S. (1998). Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci*; 3, 51-56.
- 234.Tsai, P. O., Tsai, T. H., Yu, C. H., and Ho, S. C. (2007). Evaluation of NO-suppressing activity of several Mediterranean culinary species. *Food and Chemical Toxicology*; 45, 440–447.
- 235.Tsay Y. F., Chiu C. C., Tsai C. B., Ho C. H., Hsu P. K. (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett*; 581, 2290-2300.
- 236.Tsay Y., Schroeder J. I., Feldmann K. A. and Crawford N. M. (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72, 705-713.
- 237.Van Beusichem M. L., Kirkby E. A. and Baas R. (1988). Influence of nitrate and ammonium nutrition and uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiol*. 86, 914-921.
- 238.Van der Boon J., Steenhuizen J.W., Steingröver E., 1990. Growth and nitrate concentration of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration, NH₄/NO₃ ratio and temperature of the recirculating nutrient solution. *J. Hort. Sci.*, 65, 309-321.
- 239.Van Maanen J. M. S., van Dijk A., Mulder K., de Baets M.H., Menheere P. C. A., van der Heide D., Mertens P. L. J. M. and Kleinjans J. C. S. (1994). Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicol Lett* 72:365–374.
- 240.Vincentz M., Moureaux T., Leydecker M. T., Vaucheret H. and Caboche M. (1993).

- Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.*; 3, 315-324.
241. Vittozzi L. (1992). Toxicology of nitrates and nitrites. *Food Addit Contam* 9:579–585.
242. Vogel C. S. and Dawson J. O. (1991) Nitrate reductase activity, nitrogenase activity, and photosynthesis of black alder exposed to chilling temperature. *Physiol. Plant.*; 82, 551-558.
243. von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U. (2010). CLC-b-mediated NO_3^-/H^+ exchange across the tonoplast of Arabidopsis vacuoles. *Plant and Cell Physiology*; 51, 960–968.
244. von Wirén N., Gazzarrini S. and Frommer W. B. (1997). Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *T. Ando et al. (Eds.), Plant nutrition – for sustainable food production and environment*. 41-49.
245. Walker R. (1990). Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit Contam* 7:717–768.
246. Walters, C. (1991). Nitrate and nitrite in foods. In *Nitrates and Nitrites in Food and water* (M. Hill, Ed.), pp. 93-107. Ellis Harwood, New York.
247. Wang M. Y., Glass A. D. M., Shaff J. E. and Kochian L. V. (1994). Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. *Plant Physiol.*; 104, 899-906.
248. Wang R., Guegler K., LaBrie S. T., Crawford N. M. (2000). Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell*; 12, 1491-1510.
249. Wang M. Y., Siddiqi M. Y., Ruth T. J. and Glass A. D. M. (1993). Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of NH_4^+ influx across the plasmalemma. *Plant Physiol*; 103, 1259-1267.
250. Wang R., Tischner R., Gutierrez R. A., Hoffman M., Xing X., Chen M., Coruzzi G., Crawford N. M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol*; 136, 2512-2522.
251. Webb, A.J., Patel, N., Loukogeorgakis, S., Okorie, M., Aboud, Z., Misra, S., Rashid, R., Miall, P., Deanfield, J., Benjamin, N., Macallister, R., Hobbs, A.J. and Ahluwalia, A. (2008). Acute Blood Pressure Lowering, Vasoprotective, and Antiplatelet Properties of Dietary Nitrate via Bioconversion to Nitrite. *Hypertension*. Feb 4;
252. Wege S., Jossier M., Filleur S., Thomine S., Barbier-Brygoo H., Gambale F., De Angeli A. (2010). The proline 160 in the selectivity filter of the Arabidopsis NO_3^-/H^+

- exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta. *The Plant Journal*; 63, 861–869.
253. Weiner H. and Kaiser W. (1999) 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Lett*; 455, 75-78.
254. Witter, J.P. and Balish, E. (1979). Distribution and metabolism of ingested NO₃⁻ and NO₂⁻ in germfree and conventional-flora rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 861-869.
255. Woodal J., Boxal J. G., Forde B. G., Pearson J (1996). Changing perspective in plant nitrogen metabolism: the central role of glutamine synthetase. *Sci Prog*; 79, 1-26.
256. Wray J. L. (1989). Molecular and genetic aspects of nitrite reduction in higher plants. In: Wray J.L. and Kinghorn J.R. (eds) *Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*. Oxford Science Publ, Oxford, pp 244-262.
257. Xia, D. S., Deng, D. J. and Wang, S. L. (2003). Destruction of parotid glands affects nitrate and nitrite metabolism. *J. Dent. Res.* 82, 101-105.
258. Yang Y., Lu X., Yan B., Li B., Sun J., Guo S. and Tezuka T. (2013). Bottle gourd rootstock-grafting affects nitrogen metabolism in NaCl-stressed watermelon leaves and enhances short-term salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*; 170, 653– 661.
259. Yusuf M., Fariduddin Q., Ahmad A. (2011). 28-Homobrassinolide mitigates boron induced toxicity through enhanced antioxidant system in *Vigna radiata* plants. *Chemosphere*; 85, 1574-1584.
260. Zerihun A. and Treeby M. T. (2002). Biomass distribution and nitrate assimilation in response to N supply for *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon on five *Vitis* rootstock genotypes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*; 8, 157–162.
261. Zhen R.-G., Koyro H.-W., Leight R. A., Tomos A. D. and Miller A. J. (1991). Compartmental nitrate concentration in barley root cells measured with nitrate-selective microelectrodes and by single-cell sap sampling. *Planta*; 185, 356-361.
262. Zifarelli G, Pusch M. (2010). CLC transport proteins in plants. *FEBS Letters*; 584, 2122–2127.
263. Ziliani M. (2013). Effetto della concentrazione di boro nella soluzione nutritiva sulle relazioni idriche e minerali di piante di basilico (*Ocimum basilicum* L.) coltivato in idroponica. Tesi di Laurea Magistrale. Università di Pisa; Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali.

RIASSUNTO

L'azoto (N) è un elemento essenziale per la vita e l'accrescimento delle piante entrando a far parte della struttura degli aminoacidi e di conseguenza delle proteine. Le piante assorbono N attraverso le radici principalmente come nitrato (NO_3^-) e secondariamente come ammonio (NH_4^+). Nelle cellule, l' NO_3^- è suddiviso in due frazioni: quella metabolica nel citosol e quella di riserva nel vacuolo. L' NO_3^- presente nel citosol è ridotto, ad opera della nitrato riduttasi (NR), a nitrito (NO_2^-), che a sua volta è ridotto a NH_4^+ , dalla nitrito riduttasi (NiR) nei plastidi. L' NH_4^+ così formato è incorporato negli aminoacidi attraverso una serie di reazioni catalizzate dalla glutammina sintetasi (GS) e dalla glutammato sintetasi (GOGAT). L'enzima chiave per la regolazione di tutto il processo di assimilazione dell'N è la NR. L'attività di quest'enzima (NRA) è stimolata dall' NO_3^- e dalla luce mentre è inibita dall' NO_2^- , dall' NH_4^+ , dalla glutammina e dagli altri aminoacidi. Se consumato in quantità eccessive l' NO_3^- può avere un effetto negativo sulla salute umana. L'accumulo di NO_3^- nei tessuti vegetali risulta favorito da condizioni di scarsa illuminazione, basse temperature e abbondante disponibilità di NO_3^- nel substrato di crescita.

Il boro (B) è un elemento essenziale per le piante entrando a far parte della struttura della parete cellulare e ricoprendo altre funzioni metaboliche. Un suo eccesso, però, può portare a fenomeni di tossicità nelle piante, che sviluppano clorosi e necrosi a livello fogliare, con conseguente riduzione di crescita.

In questa tesi, sono stati studiati gli effetti di diverse concentrazioni di B (0,25 e 20 mg/L) e di NO_3^- (10 mM e 20 mM) nella soluzione nutritiva su piante di basilico (*Ocimum basilicum* L.) coltivate in idroponica (floating system). Per gli esperimenti sono state impiegate due varietà di basilico, una con foglie verdi ("Tigullio"), generalmente usata come pianta aromatica, e una a foglie viola ("Red Rubin"), solitamente usata a fini ornamentali. La varietà viola presenta una maggiore concentrazione fogliare di antociani (nell'epidermide) e di altri composti antiossidanti, che hanno un ruolo fondamentale nella fotoprotezione (effetto sun-screen degli antociani) e nella tolleranza ai vari tipi di stress, compreso l'eccesso di B come dimostrato in precedenti studi (Landi et al, 2013a, 2013b; Ziliani, 2013, Landi, 2014). Ziliani (2013) aveva riscontrato un maggior contenuto di NO_3^- nelle foglie delle piante, di entrambe le varietà, quanto erano allevate in presenza di un eccesso di B (20 mg/L) nel mezzo di crescita rispetto ai livelli di NO_3^- rilevati nelle piante di controllo. I tre esperimenti riportati in questa tesi sono stati condotti per confermare o meno la relazione fra l'eccesso di B (20 mg/L) e il contenuto fogliare di NO_3^- verificando anche l'effetto della concentrazione di NO_3^- (10 mM e 20 mM) nel mezzo di crescita, e del genotipo sulla NRA determinata in vivo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti con piante di 3-5 settimane dalla germinazione.

Lo studio ha confermato la maggiore tolleranza all'eccesso di B della varietà "Red Rubin" rispetto a "Tigullio". Non è stato confermato invece il maggior contenuto di NO_3^- nelle piante coltivate in presenza di un eccesso di B, osservato negli esperimenti di Ziliani (2013). Contrariamente a quanto inizialmente ipotizzato, l'eccesso di B non ha determinato una riduzione della NRA e addirittura in "Red Rubin" la NRA è stata minore nelle piante di controllo rispetto a quelle coltivate con 20 g/L nella soluzione nutritiva.

SUMMARY

Nitrogen (N) is an essential element for plant life and growth since it is contained in amino acids and then in proteins. Principally, plant roots take up N as nitrate (NO_3^-) and secondly ammonium (NH_4^+). NO_3^- is divided into two fractions within cell: a metabolic fraction in the cytosol and storage fraction in the vacuole. Cytosolic NO_3^- is reduced by nitrate reductase (NR) to nitrite (NO_2^-), which is then reduced to NH_4^+ by nitrite reductase (NiR) in the plastids. NH_4^+ formed in this way is built-in amino acids by a series of reactions, which are catalyzed by glutamine synthetase (GS) and glutamate synthetase (GOGAT). NR is the most important enzyme for regulation of N assimilation as a whole. The activity of this enzyme (NRA) is enhanced by NO_3^- and light while is inhibited by NO_2^- , NH_4^+ , glutamine and other amino acids.

NO_3^- may have a negative effect on human health when taken in excessive quantities. NO_3^- accumulation in plant tissues is favored by low light conditions, low temperatures and abundant availability of NO_3^- in the growth substrate.

Boron (B) is an essential element for plants, taking part in the wall cell structure and performing other metabolic functions. However, high B concentration can be toxic and induce foliar chlorosis and necrosis, with consequent growth reduction.

In this thesis, the effects of different concentrations of B (0,25 e 20 mg/L) and NO_3^- (10 mM e 20 mM) in the nutrient solution were investigated in sweet basil plants (*Ocimum basilicum* L.) grown in hydroponics (floating system). The experiments were conducted with two cultivars of basil with green (“Tigullio”) or purple leaves (“Red Rubin”, usually used for ornamental purposes). The purple cultivar has a higher concentration of anthocyanins (within epidermis) and other antioxidants, which have a fundamental role in the photoprotection (anthocyanins’ sun-screen effect) and in the tolerance to other type of stress, including B toxicity as demonstrated in previous studies (Landi et al, 2013a, 2013b; Ziliani, 2013; Landi, 2014). Ziliani (2013) also found higher content of NO_3^- in the leaves of both varieties when the plants was grown with an excess of B (20 mg/L) in growth medium compared to the NO_3^- levels detected in the control plants.

Three experiments were conducted to confirm the relationship between B excess and foliar content of NO_3^- found by Ziliani (2013) and to verify the effect of NO_3^- concentration (10 mM e 20 mM) in the growth medium and genotype on *in vivo* NRA. All experiments were been performed with 3 to 5-week old plants.

The study confirmed that “Red Rubin” was more tolerance to B excess than “Tigullio”. In contrast, it was not found an higher leaf content of NO_3^- in the plants grown with an excess of B, as reported by Ziliani (2013). Contrary to the initial hypothesis, the excess of B did not result in a reduction of NRA and in “Red Rubin” NRA was even less in the control plants than in those grown with a B concentration of 20 mg/L in the nutrient solution.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare, per l'aiuto e il sostegno che mi è stato dato durante tutto lo svolgimento di questa tesi, va a Mirco, Giulia e Luca oltre che al Prof. Pardossi e al Prof. Malorgio. Inoltre, non posso non ringraziare tutti coloro che mi hanno sopportato durante questi mesi, primo fra tutti Flavio.

Più in generale ringrazio tutte le persone, compagni di corso e non, che mi sono state vicine durante questi cinque anni, rendendoli indimenticabili. Ringrazio la mia famiglia che mi ha permesso di fare questa splendida esperienza.